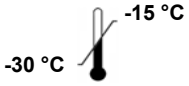
Prueba de VPH 16/18 Cervista™

REF **95-439**

Una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección del ADN de los tipos 16 y 18 del virus de papiloma humano (VPH) en muestras cervicouterinas.

Dispositivo de diagnóstico clínico *in vitro*

Contiene reactivos suficientes para 96 pruebas



Limitación de temperatura

NO almacene en un congelador sin escarcha.

Proteja de la luz.

ÍNDICE

NOMBRE Y USO PREVISTO

ABREVIATURAS USADAS

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

REACTIVOS PROVISTOS

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS

REACTIVOS Y MATERIALES ADICIONALES

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS, EXTRACCIÓN DE ADN Y ALMACENAMIENTO PARA EL ANÁLISIS

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTAS DE PROCEDIMIENTO Y PRECAUCIONES

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

CONTROL DE CALIDAD

LIMITACIONES

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

REFERENCIAS

GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

NOMBRE Y USO PREVISTO

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección cualitativa del ADN del virus de papiloma humano tipos 16 y 18 en muestras cervicouterinas.

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ utiliza la química de Invader®, un método de amplificación de la señal para la detección de secuencias específicas del ácido nucleico. Este método usa dos tipos de reacciones isotérmicas: una reacción primaria que se produce en la secuencia del ADN objetivo y una reacción secundaria que produce una señal fluorescente (consulte la Figura 1).

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ se indica:

1) En mujeres a partir de los 30 años, la prueba de VPH 16/18 Cervista™ puede utilizarse concurrente con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en combinación con citología cervicouterina para evaluar la presencia o ausencia de VPH tipos 16/18 de alto riesgo. Esta información, junto con la evaluación clínica de los antecedentes citológicos, otros factores de riesgo y las normas profesionales, puede usarse para guiar el tratamiento de las pacientes.

2) Para utilizarse en combinación con la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ en pacientes con resultados de citología cervicouterina de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) a fin de evaluar la presencia o ausencia de VPH tipos 16 y 18 de alto riesgo. Esta información, concurrente con la evaluación clínica de los antecedentes citológicos, otros factores de riesgo y las normas profesionales, puede usarse para guiar el tratamiento de las pacientes. Los resultados de esta prueba no están diseñados para evitar que las mujeres se sometan a una colposcopia.

Las muestras cervicouterinas que pueden analizarse con la prueba de VPH 16/18 Cervista™ incluyen el siguiente sistema de conservación y los siguientes dispositivos de obtención:

- Solución PreservCyt® con sistema de conservación ThinPrep® para pruebas de Papanicolaou
- Dispositivo tipo brocha (p. ej., brocha Rovers Cervex®, Wallach Papette®) o brocha/espátula para análisis cervicouterino

ADVERTENCIAS

- Esta prueba no está diseñada para determinar la necesidad de tratamiento (es decir, tratamiento mediante escisión o ablación del cuello uterino) en ausencia de displasia cervical de alta malignidad. Las pacientes con diagnósticos positivos de VPH 16/18 deben ser monitoreadas estrictamente para detectar el desarrollo de displasia cervical de alta malignidad de acuerdo con las pautas de las prácticas profesionales actuales.
- La prueba de VPH 16/18 Cervista™ no está diseñada para utilizarse como un análisis independiente. Los resultados deben interpretarse junto con los resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y la prueba citológica cervicouterina.
- La prueba de VPH 16/18 Cervista™ no está diseñada para utilizarse en mujeres menores de 30 años con citología cervical normal.

- La prueba de VPH 16/18 Cervista™ no está diseñada para sustituir el análisis de detección citológica cervicouterina habitual.
- El uso de esta prueba todavía no se ha evaluado para el tratamiento de mujeres con anomalías citológicas o histológicas previas, histerectomías, embarazo, posmenopausia u otros factores de riesgo (p. ej., VIH+, inmunodepresión, antecedentes de ITS).

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ está diseñada para mejorar los métodos existentes para la detección de la enfermedad cervicouterina y debe usarse concurrente con la información clínica derivada de otras pruebas de diagnóstico y detección, exploraciones físicas y antecedentes clínicos completos según los procedimientos apropiados para el tratamiento de la paciente.

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ no debe usarse como única base para la evaluación clínica y el tratamiento de las pacientes.

ABREVIATURAS USADAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNg:	ADN genómico
ASC-US:	células escamosas atípicas de significado indeterminado
CIN:	neoplasia intraepitelial cervicouterina
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio)
FAM:	fluoróforo carboxifluoresceína
FOZ:	curvatura sobre cero (la señal de la muestra o del control dividida por la señal de control negativo)
FRET:	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
HIST2H2BE:	gen de la histona humana 2, gen H2be
LoB	límite de blanco
LoD	límite de detección
LSIL:	lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
Máx.	máximo
Mín.	mínimo
NILM	resultado negativo del análisis de detección de lesiones intraepiteliales o neoplasia. Esta categoría engloba a las categorías anteriores: "dentro de los límites normales" y "cambios celulares benignos".
NTC:	control negativo
Oligo:	oligonucleótido
Pap:	prueba citológica cervicouterina de Papanicolaou
Red:	fluoróforo rojo Redmond®
RFU:	unidad de fluorescencia relativa
TWT:	Third Wave Technologies, Inc.
VPH:	virus de papiloma humano

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Se han registrado más de 100 tipos de VPH en la bibliografía, aproximadamente 40 de los cuales infectan el área anogenital y se transmiten por vía sexual. El VPH anogenital está asociado con casi todos los tipos de cáncer cervicouterino.[1] Anteriormente, se ha demostrado que es muy fácil prevenir el cáncer cervicouterino cuando se emplean programas de análisis citológicos y de detección del VPH para facilitar la detección y el tratamiento de lesiones precancerosas.

De los tipos de VPH de transmisión sexual, 14 genotipos oncogénicos (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) se consideran de alto riesgo debido a su íntima asociación con tipos de cáncer cervicouterino (en comparación con los tipos de VPH de bajo riesgo, que prácticamente no se asocian al cáncer cervicouterino).[2,3,19] Aun así, la gran mayoría de las infecciones por VPH de alto riesgo son erradicadas.[4] Muy pocas mujeres con diagnósticos positivos de ADN de VPH de alto riesgo manifiestan una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) que indique una CIN2-3 subyacente o cáncer.[5] El riesgo absoluto de presentar una anomalía citológica incidental debido a una infección por VPH de alto riesgo varía en las distintas poblaciones.

La presencia de ADN de VPH de alto riesgo concurrente con un resultado de citología equívoca o ambigua (ASC-US) predispone a la mujer a un mayor riesgo de presentar una neoplasia intraepitelial cervicouterina subyacente 2 ó 3 (CIN2 o CIN3).[6,7,8] La CIN3, si bien se produce sólo en aproximadamente un 5% de los casos de ASC-US,[9] es un precursor inmediato del cáncer cervicouterino y, por consiguiente, su detección es muy importante para el tratamiento de la paciente.[3,7]Por lo tanto, la identificación de las mujeres con citología ASC-US concurrente con una infección por VPH de alto riesgo es útil para que los médicos puedan decidir quiénes deben controlarse o tratarse más estrictamente.[3,8,10,11,12,13]

La bibliografía científica actual sugiere que una infección por VPH de alto riesgo persistente es el principal factor del riesgo de manifestar neoplasia cervicouterina de alto grado y cáncer.[4,5,15] La persistencia evidente puede representar una infección continua por un sólo tipo de VPH, múltiples tipos de VPH o una reinfección. Sin embargo, las mujeres con citología cervicouterina normal con resultados negativos de VPH de alto riesgo aparentemente presentan bajos riesgos de contraer o manifestar lesiones cervicouterinas precancerosas.[8,10]

Se sabe que los tipos 16 y 18 de VPH son altamente oncogénicos y persistentes, y que se asocian con un 60% y un 10% de los tipos de cáncer cervicouterino, respectivamente, y a la vez presentan las tasas de eliminación más bajas en los procedimientos de exploración cervicouterina.[10,14,15,16] En consecuencia, numerosos estudios informan que las mujeres infectadas por los tipos 16 y 18 de VPH presentan un riesgo significativamente más alto de manifestar ≥ CIN3 que las mujeres infectadas por otros tipos de alto riesgo.[3,10,11,13] Desde 2002, varios grupos de profesionales sanitarios de los Estados Unidos comenzaron a publicar pautas para el tratamiento de las pacientes con recomendaciones acerca de cómo realizar análisis de detección de cáncer cervicouterino en mujeres según la edad, la presencia de anomalías citológicas en una muestra cervicouterina y otros factores.[6,17,18,19] Estas pautas para el tratamiento de las pacientes recomiendan la realización de pruebas para la detección de tipos de VPH de alto riesgo como una herramienta de detección habitual, concurrente con la citología, en dos instancias: 1) para mujeres a partir de los 30 años ; y 2) como herramienta de diagnóstico adicional para mujeres a partir de los 21 años con ASC-US.

De acuerdo con *2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests* (Pautas consensuadas de 2006 para el tratamiento de mujeres con resultados anómalos en las pruebas de detección de cáncer cervicouterino), las mujeres con resultados de citología cervicouterina negativos que tienen resultados positivos para la presencia de ADN de VPH de alto riesgo se beneficiarían con la genotipificación de los tipos específicos de VPH.[1,19] Los estudios respaldan la validez de la genotipificación de los tipos 16 y 18 de VPH, ya sea utilizada como seguimiento de una prueba de VPH de alto riesgo o realizada concurrentemente.[1,2,3,10,13,19,20]

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cervista™ para VPH 16/18 es una prueba cualitativa *in vitro* para la detección del ADN de dos tipos de VPH de alto riesgo: 16 y 18. La prueba de VPH 16/18 Cervista™ usa la química de Invader® como método de multiplicación de la señal para la detección de secuencias específicas de ácido nucleico. La tecnología Invader® usa dos tipos de reacciones isotérmicas: una reacción primaria que se produce en la secuencia del ADN objetivo y una reacción secundaria que produce una señal fluorescente (consulte la Figura 1). En la reacción primaria, dos tipos de oligonucleótidos específicos de la secuencia (es decir, un oligonucleótido de sonda y un oligonucleótido de Invader®) se unen a la secuencia del ADN objetivo. Cuando los oligonucleótidos se superponen en al menos un par de base en la secuencia objetivo, se forma una estructura invasiva que actúa como un sustrato de la enzima Cleavase®. La enzima segmenta la porción 5' (cola) de la sonda en la ubicación de la superposición.

Las sondas están presentes en un elevado exceso molar y activan y desactivan rápidamente la secuencia objetivo de modo que se generan muchas colas segmentadas de 5' por secuencia objetivo. Luego, las colas segmentadas se unen a un oligonucleótido de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) en forma de horquilla y crean otra estructura invasiva que la enzima Cleavase® reconoce como un sustrato. La enzima segmenta los oligonucleótidos de la FRET entre el fluoróforo y la molécula extintora y produce una señal fluorescente a medida que las colas segmentadas entran o salen del ciclo. Para cada copia del objetivo, las reacciones primaria y secundaria combinadas generan una multiplicación de la señal de 10^6 – 10^7 veces por hora.[21] Las secuencias de las colas y los oligonucleótidos de la FRET son universales, ya que no son complementarios de la secuencia objetivo.

Los reactivos para esta prueba se proporcionan como dos mezclas de oligonucleótidos, que detectan VPH 16 y VPH 18. Los oligonucleótidos que se unen al gen de la histona humana 2 (H2be, HIST2H2BE) también están presentes en estas dos mezclas de oligonucleótidos. El HIST2H2BE funciona como un control interno que produce una señal desde el ADN celular presente en la muestra. El formato de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ permite la detección simultánea de secuencias de ADN de VPH y HIST2H2BE en un mismo pocillo al utilizar dos secuencias de colas de 5' diferentes en las sondas y también dos oligonucleótidos de la FRET diferentes, cada uno con un fluoróforo de distinto espectro (FAM y Red). Por su diseño, las colas de 5' liberadas se unen sólo con sus respectivos oligonucleótidos de FRET para generar una señal objetivo específica (consulte la Figura 1).

Un resultado positivo para VPH 16, VPH 18 ó VPH 16 y VPH 18 está representado por una señal del FAM fluorescente que se encuentra sobre un valor de corte derivado empíricamente. Para cada reacción, un resultado negativo está representado por una señal fluorescente del FAM que se encuentra por debajo del mismo valor de corte derivado empíricamente. Como medio de determinación de la cantidad relativa de ADN de la muestra en cada reacción, el gen

de la histona humana 2 se mide mediante una señal de color rojo fluorescente que se encuentra sobre un valor de corte derivado empíricamente en cada reacción. La medida de este objetivo funciona como mecanismo de control de calidad para confirmar que un resultado negativo no se debe a una muestra insuficiente. El objetivo de control interno también funciona como medida de procesamiento interno para asegurar que el procedimiento de la prueba se haya realizado correctamente.

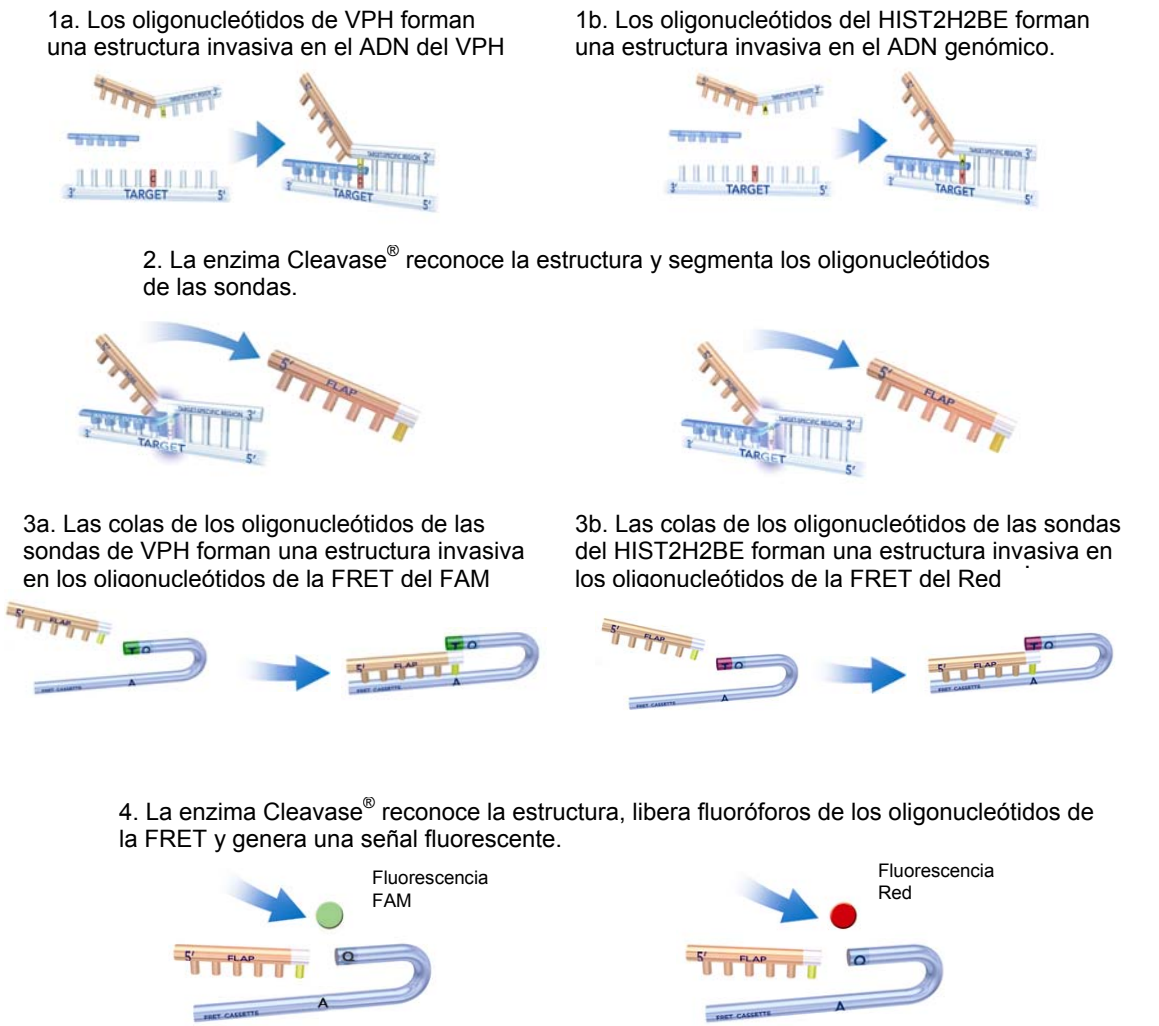

1a. Los oligonucleótidos de VPH forman una estructura invasiva en el ADN del VPH
1b. Los oligonucleótidos del HIST2H2BE forman una estructura invasiva en el ADN genómico.
TARGET
2. La enzima Cleavase® reconoce la estructura y segmenta los oligonucleótidos de las sondas.
FLAP
3a. Las colas de los oligonucleótidos de las sondas de VPH forman una estructura invasiva en los oligonucleótidos de la FRET del FAM
3b. Las colas de los oligonucleótidos de las sondas del HIST2H2BE forman una estructura invasiva en los oligonucleótidos de la FRET del Red
4. La enzima Cleavase® reconoce la estructura, libera fluoróforos de los oligonucleótidos de la FRET y genera una señal fluorescente.
Fluorescencia FAM
Fluorescencia Red

Figura 1: Una representación gráfica de la química de Invader® en la prueba de VPH 16/18 Cervista™.

REACTIVOS PROVISTOS

Tabla 1: Contenidos de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ (REF 95-439)

Reactivo	Abreviatura de la etiqueta del vial	Cantidad de viales y volumen del reactivo	Descripción
VPH 16 Mezcla de oligonucleótidos	O16 (Tapa y tira rojas)	1 x 1400 µl	Oligonucleótidos con afinidad al VPH tipo 16 y al HIST2H2BE humano suspendidos en agua y en amortiguador MOPS (pH 7.5)
VPH 18 Mezcla de oligonucleótidos	O18 (Tapa y tira de color azul verdoso)	1 x 1400 µl	Oligonucleótidos con afinidad al VPH tipo 18 y al HIST2H2BE humano suspendidos en agua y en amortiguador MOPS (pH 7.5)
Solución de la enzima Cleavase®	E (Tapa y tira púrpuras)	1 x 1100 µl	Enzima Cleavase® suspendida en 140 mM de MgCl2, 10 mM de Tris (pH 8.0), 25 mM de KCl, 0.25% de Tween 20, 0.25% de Nonidet P40, 25% de glicerol y 0.05 mg/ml de BSA
Control de VPH 16	C16 (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	500 copias/µl de ADN de VPH tipo 16 clonado y 3000 copias/µl de ADN del HIST2H2BE clonado en el ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA
Control de VPH 18	C18 (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	500 copias/µl de ADN de VPH tipo 18 clonado y 3000 copias/µl de ADN del HIST2H2BE clonado en el ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA
Control negativo	NTC (Tapa transparente y tira negra)	1 x 200 µl	ARNt de levadura y 10 mM de Tris, 0.1 mM de amortiguador EDTA

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Seguridad y precauciones de manipulación

1. Deben emplearse precauciones de seguridad universales para el manejo de tejidos o líquidos humanos. Las muestras deben desecharse según las normas locales.
2. Los componentes del producto (residuos o empaque del producto) pueden considerarse desechos de laboratorio. Deseche los reactivos no utilizados y desperdicios según las normas federales, estatales y locales aplicables.

REQUISITOS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Almacene todos los reactivos entre –30 °C y –15 °C.
- No use reactivos pasada la fecha de vencimiento indicada en la parte externa del paquete.

- No almacene en un congelador sin escarcha.
- Proteja de la luz.
- Antes de usar, saque los reactivos del congelador y déjelos al menos 30 minutos a temperatura ambiente o hasta que la inspección visual indique que no hay material congelado presente.
- Agite con vórtex los reactivos antes de usarlos.
- Third Wave Technologies recomienda no más de diez (10) ciclos de congelación-descongelación para todos los reactivos de las pruebas de VPH 16/18 Cervista™.

REACTIVOS Y MATERIALES ADICIONALES

El software Invader Call Reporter™ es un componente necesario de esta prueba de diagnóstico in vitro. Se proporciona este software una vez con el pedido inicial de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ y posteriormente, con el lanzamiento de actualizaciones de las versiones del software.

El kit de extracción de ADN Genfind™ es un accesorio de la prueba de VPH 16/18 Cervista™. Comuníquese con Third Wave Technologies para solicitar el kit de extracción de ADN Genfind™ (REF 95-449).

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

Materiales fungibles

- Puntas de pipetas, con barrera de filtro y sin nucleasa
- Placas de polipropileno de 96 pocillos
- Sellador de placa transparente
- Aceite mineral para biología molecular
- Tubos estériles de 2 ml de polipropileno y tapas roscadas

Equipos

- Pipetas
- Agitador vórtex
- Lector de placa de fluorescencia (consulte la Tabla 3)
- PC de escritorio con sistema operativo Microsoft® Windows® XP con Microsoft® Excel® y el software Adobe® Reader®.
- Termociclador u horno capaz de mantener las temperaturas de reacción recomendadas.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS, EXTRACCIÓN DE ADN Y ALMACENAMIENTO PARA EL ANÁLISIS

Las muestras cervicouterinas deben obtenerse en la solución PreservCyt®, el sistema de conservación de la prueba de Papanicolau ThinPrep®, mediante un dispositivo tipo brocha (p. ej., la brocha Rovers Cervex®, Wallach Papette®) o una brocha/espátula para análisis cervicouterino.

Para la prueba de VPH 16/18 Cervista™, las muestras cervicouterinas pueden almacenarse a temperatura ambiente (20 °C a 30 °C) en solución PreservCyt® hasta 18 semanas antes de realizar la prueba. Las muestras en solución PreservCyt® no pueden congelarse.

Debe extraerse ADN debe obtenerse de las muestras en PreservCyt® mediante el kit de extracción de ADN Genfind™ (REF 95-449).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Nota: extraiga ADN de las muestras cervicouterinas obtenidas en solución PreservCyt® mediante el kit de extracción de ADN Genfind™ **(**REF 95-449**)** antes de comenzar el procedimiento de reacción. El ADN residual extraído como parte de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ puede utilizarse para la prueba de VPH 16/18 Cervista™.

Procedimiento de reacción

1. Agregue 10 µl del ADN de cada control y de cada muestra a dos pocillos de una placa de 96 pocillos según se indica en el diseño de la placa de la prueba (consulte la Figura 2).

	Mezcla de VPH 16	Mezcla de VPH 18	Mezcla de VPH 16	Mezcla de VPH 18	Mezcla de VPH 16	Mezcla de VPH 18	Mezcla de VPH 16	Mezcla de VPH 18	Mezcla de VPH 16	Mezcla de VPH 18	Mezcla de VPH 16	Mezcla de VPH 18
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	C16	C16	S06	S06	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
B	C18	C18	S07	S07	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
C	NTC	NTC	S08	S08	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
D	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
E	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
F	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
G	S04	S04	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
H	S05	S05	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45

Figura 2: Diseño de la placa de la prueba de VPH 16/18 Cervista™

2. Cubra bien cada pocillo con 20 µl de aceite mineral y utilice cinta para sellar la placa y minimizar la evaporación.
3. Incube las muestras a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador.
4. Mezcle bien los reactivos y las mezclas de reacción de forma constante con anterioridad al uso.
5. Prepare las mezclas de reacción como se indica en la hoja de preparación de la mezcla (impresa del software Invader Call Reporter™) o según los cálculos en la Tabla 2. Prepare una mezcla reactiva para cada una de las dos mezclas de oligonucleótidos de VPH antes de cada uso.

Tabla 2: Instrucciones para la preparación de la mezcla de reacción

Reactivo	*µ*l/Reacción	N.º de reacciones (muestras y controles (*k*))	Volumen total
Mezcla de oligonucleótidos de VPH 16 ó 18	8 *µ*l	*k*	=8*k*(1.25) *µ*l
Solución de la enzima Cleavase®	2 *µ*l	*k*	=2*k*(1.25) *µ*l
Volumen total de la mezcla	**10 *µ*l**	***k***	**=10*k*(1.25) *µ*l**

6. Reduzca la configuración de la temperatura del termociclador a 63 °C.
7. Agregue 10 *µ*l de la mezcla de reacción adecuada a cada pocillo que contenga un control o una muestra (consulte la Figura 2), teniendo cuidado de aspirar con la pipeta por debajo del aceite mineral.
8. Incube la placa en una configuración de 63 °C durante 4 horas.

Obtención de datos

1. Lleve siempre la placa a temperatura ambiente antes de realizar la lectura. Si no se puede leer la placa de inmediato, almacénela a una temperatura entre 2 °C y 8 °C (se recomienda leer la placa dentro de las 24 horas de realizada la prueba).
2. Coloque la placa de 96 pocillos (el pocillo A1 debe estar en la esquina superior izquierda) en el recipiente de la placa del lector de la placa de fluorescencia. Quite la cinta que sella la placa.
3. Defina el tipo de placa para configurar las coordenadas y la altura de la sonda para el tipo de placa específico. Guarde las configuraciones.
4. Lea toda la placa. Se requieren dos lecturas independientes: FAM (Excitación = 485 nm, Emisión = 535 nm) y Red (Excitación = 560 nm, Emisión = 612 nm). Para detectar la señal del VPH, debe configurarse el instrumento de manera que pueda detectar primero el fluoróforo del FAM. Para detectar el ADN genómico de la muestra, el instrumento debe configurarse de modo que pueda detectar primero el fluoróforo Red.
5. Ajuste la ganancia del lector de la placa de fluorescencia para que esté en el rango dinámico lineal del lector según las instrucciones del fabricante. La ganancia debe establecerse de modo que el control negativo (NTC) muestre valores que estén en el rango de fondo del lector, con una RFU mínima de 600. No es necesario que los valores del NTC sean idénticos para las lecturas del FAM y Red.

Tabla 3: Especificaciones/configuraciones del lector de la placa de fluorescencia

Parámetros de medición de etiquetado múltiple	Medición 1 (FAM)	Medición 2 (Red)
Modo de lectura:	Superior	Superior
Longitud de onda/ancho de banda de la excitación:	485/20 nm	560/20 nm
Longitud de onda/ancho de banda de la emisión:	535/25 nm	612/10 nm
Cantidad de destellos:	10	10
Tiempo de integración:	20 µs	20 µs

NOTAS DE PROCEDIMIENTO Y PRECAUCIONES

1. Los laboratorios deben aplicar buenas prácticas de laboratorio y cumplir con todos los requisitos de las reglamentaciones federales, estatales y locales aplicables.
2. No agregue reactivos de diferentes lotes o de diferentes viales del mismo lote. Estos componentes han sido evaluados como una unidad. No intercambie componentes de otras fuentes o de lotes diferentes.
3. No use los reactivos después de la fecha de vencimiento.
4. Mezcle bien las muestras, los reactivos y las mezclas de reacción de forma constante.
5. Use puntas de pipeta de barrera en aerosol, estériles, descartables y sin nucleasa para cada adición y transferencia para evitar la contaminación cruzada.
6. Utilice tubos de polipropileno descartables sin nucleasa para la preparación de las mezclas de reacción.
7. Verifique que el tipo de placa de 96 pocillos sea compatible con el termociclador específico y el lector de la placa de fluorescencia que se usará antes de comenzar la prueba.
8. Deben agregarse controles en las posiciones designadas en el diseño de la placa de la prueba que se muestra en la Figura 2 a fin de que el software Invader Call Reporter™ funcione correctamente.
9. Utilice aceite mineral nuevo para la configuración de cada reacción (no transfiera estos reactivos nuevamente al contenedor original una vez que los haya aplicado).
10. Consulte el diseño de la placa de la prueba a fin de asegurarse de haber agregado la mezcla correcta en la columna apropiada.
11. Siempre coloque la punta de la pipeta cerca de la parte inferior del pocillo para asegurarse de que la mezcla de reacción se agregue debajo del aceite mineral. Para mezclar, llene y vacíe cuidadosamente la punta de la pipeta de 3 a 5 veces.
12. Debe hacerse un seguimiento del procedimiento de la prueba de VPH 16/18 Cervista™, los controles de calidad y la interpretación de los resultados para obtener resultados confiables de la prueba.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El valor de la relación entre la señal y el ruido (señal de la muestra medida con respecto a una señal de un pocillo de la reacción con control negativo) se denomina valor FOZ (curvatura sobre cero). Los valores FOZ son generados para las reacciones de VPH 16 y VPH 18. Un resultado final positivo, negativo o indeterminado para cualquier muestra en particular se genera sobre la base del análisis de dos pocillos de la reacción independientes. Cuando el valor FOZ del VPH 16 ó el valor FOZ del VPH 18 es mayor que 2.13, la muestra resulta positiva para VPH 16 ó VPH 18.

Una llamada indeterminada se genera en tres condiciones diferentes: 1) cuando la diferencia porcentual entre los valores FOZ del ADNg es ≥ 25.0% (diferencia porcentual alta), 2) cuando los valores FOZ de ambos VPH son < 0.7 (FOZ del VPH bajo) y 3) cuando el valor FOZ promedio del ADNg de una muestra negativa es < 1.5 (ADNg bajo). Una llamada

indeterminada es indicadora de una mezcla insuficiente, un error en la medición en pipeta o un ADNg inadecuado en la muestra (consulte la Guía de resolución de problemas).

En la Figura 3 se muestra un resumen del criterio de llamada de muestra descrito arriba.

Terminología

FOZ del VPH: para cada mezcla de oligonucleótidos del VPH, la señal del FAM de la muestra dividida por la señal del FAM del control negativo.

FOZ promedio del ADNg: el valor promedio determinado a partir de los dos valores FOZ del ADN genómico obtenidos de ambas mezclas de reacción, calculado al dividir la señal del Red de la muestra por la señal del Red del control negativo.

Diferencia porcentual del FOZ del ADNg: el valor absoluto de la diferencia entre los valores FOZ del ADN genómico de VPH 16 y VPH 18 dividido por el valor FOZ promedio del ADN genómico de las dos mezclas de oligonucleótidos del VPH.

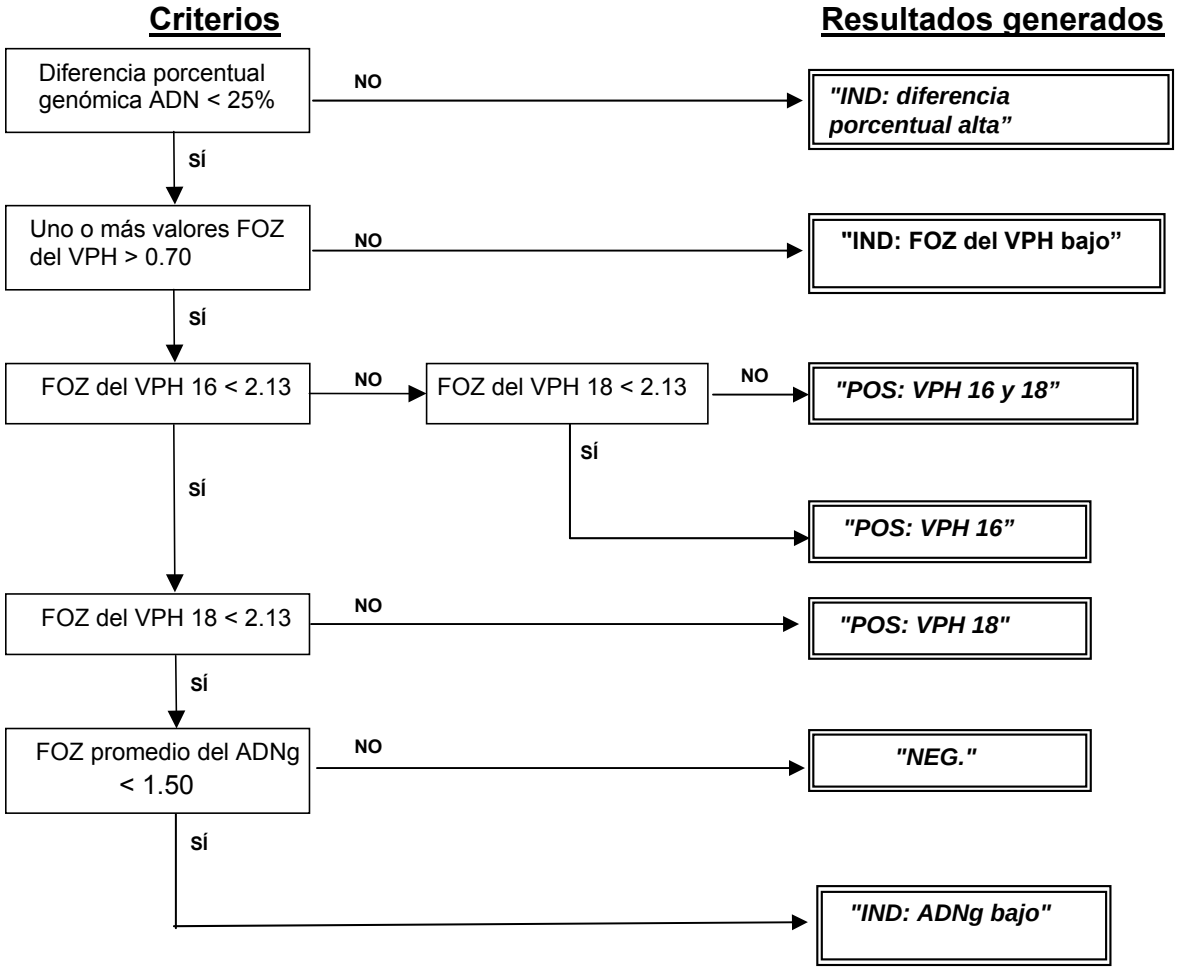


Figura 3: Criterios de llamada de muestra ordenados de arriba a abajo de la prueba de VPH 16/18 Cervista™

Nota: la prueba de VPH 16/18 Cervista™ no requiere el uso de una zona equívoca o de reiteración de la prueba.

Tabla 4: Interpretación de los resultados de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ cuando los resultados de VPH de alto riesgo son positivos[b].

Resultado de la prueba de VPH 16/18 Cervista™[c]	Informe del resultado	Interpretación para pacientes ≥ 30 años con citología NILM[a]	Interpretación para las pacientes con citología ASC-US
POS: VPH 16	VPH tipo 16 detectado	Probabilidad baja pero incrementada de que la CIN de alto grado subyacente se detecte en una colposcopia. La bibliografía clínica sugiere que es posible el desarrollo de una enfermedad de alto grado. [3,10,11,19]	Probabilidad incrementada de que la CIN subyacente de alto grado se detecte en una colposcopia.
POS: VPH 18	VPH tipo 18 detectado		
POS: VPH 16 y 18	VPH tipos 16 y 18 detectados		
NEG[d]	VPH tipos 16 ó 18 no detectados	Baja probabilidad de CIN2-3 subyacente o cáncer. Los resultados no están diseñados para impedir que las mujeres procedan a someterse a una colposcopia o se vuelvan a someter a pruebas para la detección de VPH. [3,10,11,19]	La probabilidad de CIN2-3 subyacente o de cáncer es menor pero la infección por otros tipos de VPH de alto riesgo que no son 16/18 aún presenta un riesgo. Los resultados no están diseñados para evitar que las mujeres se sometan a una colposcopia.
IND: CV porcentual alto	Indeterminado	Estado desconocido del VPH 16/18	
IND: ADNg bajo			

[a]Según las pautas consensuadas de 2006, a partir de los 30 años las mujeres con citología de mayor gravedad que la de ASC-US (que incluye ASC-H, LSIL o superior) deben realizarse una colposcopia independientemente de los resultados de la prueba de VPH.
[b]En los casos en los que se realiza en el mismo momento una prueba de VPH de alto riesgo y de VPH 16/18 y se obtiene un resultado de alto riesgo negativo junto con un resultado de 16/18 positivo, el resultado de 16/18 no es interpretable. SI los resultados de ambas pruebas son negativos, interprete los resultados de la misma manera que lo haría con un resultado negativo de alto riesgo.
[c]La prueba de VPH 16/18 Cervista™ no determina si hay tipos de VPH de alto riesgo distintos de los tipos 16/18 presentes. Una paciente puede estar simultáneamente infectada por múltiples tipos de VPH.
[d]Las pacientes con resultado positivo en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y negativo en la prueba de VPH 16/18 Cervista™ tienen más probabilidad de estar infectadas por un tipo de VPH de alto riesgo que no es 16/18.

CONTROL DE CALIDAD

Control interno

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ incluye un control interno que determina la cantidad relativa de ADN de la muestra en cada reacción. El control interno, el gen de la histona humana 2, se mide mediante una señal de color rojo fluorescente, que se encuentra sobre un valor de corte derivado empíricamente en cada reacción. La medida de este objetivo funciona como mecanismo de control de calidad para confirmar que un resultado negativo no se debe a una muestra insuficiente. El objetivo de control interno también funciona como medida de procesamiento interno para asegurar que el procedimiento de la prueba se haya realizado correctamente.

Controles externos

Control negativo

El control negativo debe realizarse en cada placa de análisis y los resultados deben cumplir los siguientes criterios para que las muestras de la placa sean válidas. Si no cumplen estos criterios, las muestras y los controles de esa placa no serán válidos y deberán repetirse (consulte el resumen de la Tabla 5):

1. La señal mínima para cada mezcla debe ser superior o igual a 600 RFU (≥ 600).
2. La diferencia porcentual entre las señales del ADNg de ambas mezclas debe ser menor al 30% (< 30%).

Tabla 5: Criterios de control negativo

Resultado	Señal mín. de VPH	Señal mín. de ADNg	Diferencia porcentual máx. (ADNg)
Válido	600	600	29.9%

Controles positivos

Deben realizarse controles de VPH (VPH 16, VPH 18) en cada placa de análisis y los resultados deben cumplir los siguientes criterios para que la prueba sea válida. Si los controles no cumplen estos criterios, las muestras de esa placa tampoco serán válidas y deberá repetirse la prueba (consulte el resumen de la Tabla 6).

1. El valor FOZ del VPH se determina al dividir la señal del FAM del control por la señal del FAM del control no positivo para cada mezcla respectiva. El control del VPH 16 debe generar un valor FOZ del VPH positivo (≥ 2.13) sólo para la mezcla de oligonucleótidos del VPH 16 y el control de VPH 18 debe generar un valor FOZ del VPH positivo (≥ 2.13) sólo para la mezcla de oligonucleótidos de VPH 18.
2. El promedio de FOZ del ADNg de las dos mezclas debe ser superior o igual a 1.50 (≥ 1.50), en caso contrario, el control no es válido para el ADN genómico bajo.
3. La diferencia porcentual entre los valores FOZ del ADNg de ambas mezclas debe ser menor al 25% (< 25%).

Tabla 6: Criterios de control del VPH

Control	Resultado	FOZ del VPH 16	FOZ del VPH 18	FOZ promedio del ADNg	Diferencia porcentual FOZ del ADNg
Control de VPH 16	Control válido	≥ 2.13	≤ 2.13	≥ 1.50	< 25.0%
Control de VPH 18	Control válido	≤ 2.13	≥ 2.13	≥ 1.50	< 25.0%

Nota: es posible analizar controles externos adicionales según las pautas o requisitos de las reglamentaciones o de las organizaciones de acreditación locales, estatales o de cada país. Los análisis de controles externos adicionales deben realizarse en pocillos designados para las muestras de las pacientes según el diseño de la placa.

Verificación de la prueba

1. Los resultados de la muestra son válidos cuando los controles positivos y negativos muestran los resultados correctos. Si el control negativo o alguno de los resultados de los controles positivos no son válidos, los resultados de las muestras en la placa no serán válidos y deberán repetirse las pruebas. Consulte las secciones de Resolución de problemas en este prospecto y en el Manual del usuario del software Invader Call Reporter™.
2. Debe cumplirse con todos los requisitos de control de calidad estipulados por las reglamentaciones locales, estatales y federales, así como con los requisitos de acreditación correspondientes.

LIMITACIONES

1. La prueba de VPH 16/18 Cervista™ sólo detecta el ADN de los tipos 16 y 18 del VPH. No detecta los tipos de VPH de alto riesgo 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Tampoco detecta los tipos de VPH de bajo riesgo, dado que no se conoce ninguna utilidad clínica para las pruebas de detección de dichos tipos de VPH.[19]
2. La prueba de VPH 16/18 Cervista™ muestra una reactividad cruzada con niveles altos del VPH de alto riesgo tipo 31. Se observó un resultado positivo para VPH 16 con 10^7 copias/reacción de VPH tipo 31.
3. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por VPH 16 ó 18 porque los niveles muy bajos de infección o un error en la muestra pueden generar un resultado falso negativo.
4. La prueba se validó para utilizar con muestras citológicas cervicouterinas obtenidas en solución PreservCyt® con una brocha Rovers Cervex®, Wallach Papette® o una brocha/espátula para análisis cervicouterino.
5. El rendimiento de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ se estableció con el uso del ADN extraído con el kit de extracción de ADN Genfind™.
6. El rendimiento de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ se estableció con el uso de muestras citológicas cervicouterinas PreservCyt® procesadas en el procesador ThinPrep 2000; no se estableció con el uso de otros procesadores.
7. El rendimiento de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ no se estableció adecuadamente para las pacientes vacunadas contra el VPH.
8. Se observó interferencia en las muestras cervicouterinas contaminadas con niveles altos (2%) de jalea anticonceptiva o cremas antimicóticas cuando se aisló el ADN con el kit de extracción de ADN Genfind™. En estas condiciones, pueden obtenerse resultados falsos negativos.
9. La prueba de ADN de VPH 16/18 Cervista™ para los tipos de papiloma humano 16 y 18 no se recomienda para evaluación en los casos de sospecha de abuso sexual.
10. La prevalencia de la infección por VPH en una población puede afectar el rendimiento. Los valores predictivos positivos disminuyen al analizar poblaciones con baja prevalencia o pacientes sin riesgo de infección.
11. La infección por VPH no es un indicador de HSIL citológica o CIN de alto grado subyacente ni implica que se manifestará una CIN2-3 o cáncer. La mayoría de las mujeres infectadas por uno o más tipos de VPH de alto riesgo no desarrollan CIN2-3 ni cáncer.

12. Un resultado negativo para VPH 16/18 no excluye la posibilidad de manifestar HSIL citológica o CIN2-3 subyacentes o cáncer.
13. Las muestras en la solución PreservCyt® que contienen volúmenes menores a 2 ml después de la preparación de los portaobjetos de la prueba de Papanicolau con ThinPrep® se consideran inadecuadas para la prueba de VPH 16/18 Cervista™.

RESULTADOS PREVISTOS

Prevalencia de VPH 16 y VPH 18 de alto riesgo

El rango de prevalencia informada de infección por VPH en mujeres es muy amplio, desde el 14% hasta más del 90%.[22] Diversos factores pueden afectar la prevalencia del VPH entre las poblaciones de pacientes debido a la heterogeneidad en la ubicación geográfica, la edad, el número de parejas sexuales, los antecedentes de citología cervicouterina anormal, junto con las diferencias en las técnicas de muestreo, los métodos de prueba y la naturaleza intermitente de la infección. El estudio clínico multicéntrico y prospectivo de VPH 16/18 Cervista™ incluyó a mujeres de 89 sitios clínicos en 23 estados en todo el territorio de los Estados Unidos, lo que produjo una población de pacientes demográficamente diversa. Las tablas 7 y 8 muestran la prevalencia de VPH 16 y VPH 18 observada en el estudio, estratificada por edad.

Tabla 7: Prevalencia de VPH 16 y VPH 18 en mujeres con citología ASC-US estratificada por edad

Grupo etario	Prevalencia del VPH 16	Prevalencia del VPH 18	Prevalencia del VPH 16 y 18 Positivo
18 < 21	31% (40/129)	7.8% (10/129)	1.6% (2/129)
21 < 30	23.7% (117/493)	6.3% (31/493)	1.6% (8/493)
30 < 39	11.9% (37/312)	2.6% (8/312)	0.6% (2/312)
39 < 49	8.3% (22/266)	1.9% (5/266)	0% (0/266)
49 < 59	5.9% (7/118)	1.7% (2/118)	0% (0/118)
≥ 59	13.3% (6/45)	2.2% (1/45)	0% (0/45)
Todos	16.8% (229/1363)	4.2% (57/1363)	0.9% (12/1363)

Tabla 8: Prevalencia de VPH 16 y VPH 18 en mujeres con citología NILM estratificada por edad

Grupo etario	Prevalencia del VPH 16	Prevalencia del VPH 18	Prevalencia del VPH 16 y 18 Positivo
30 < 40	3.4% (21/616)	0.8% (5/616)	0.2% (1/616)
40 < 50	4.0% (27/674)	0.7% (5/674)	0% (0/674)
50 < 60	5.1% (25/486)	1.0% (5/486)	0.2% (1/486)
60 < 70	3.9% (6/154)	0% (0/154)	0% (0/154)
≥70	0% (0/30)	0% (0/30)	0% (0/30)
Todos	4.0% (79/1960)	0.8% (15/1960)	0.1% (2/1960)

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad clínica y especificidad de la prueba VPH 16/18 Cervista™ en mujeres con resultados de citología cervicouterina ASC-US

Se realizó un estudio clínico multicéntrico y prospectivo para evaluar el rendimiento de la prueba VPH 16/18 Cervista™ entre las pacientes con resultados de citología ASC-

US para determinar la necesidad de derivación para realizar una colposcopia. Todas las características de rendimiento clínico se establecieron mediante muestras citológicas líquidas tratadas con ThinPrep. Las muestras cervicouterinas iniciales en ThinPrep se clasificaron siguiendo el sistema Bethesda 2001. Todas las mujeres (a partir de los 18 años) con resultados citológicos de ASC-US durante los procedimientos de prueba de detección de cáncer cervicouterino de rutina fueron invitadas a participar en el estudio antes de conocer el estado de VPH. Para las mujeres que dieron su consentimiento, posteriormente se obtuvieron sus muestras iniciales de ASC-US residuales en ThinPrep para la prueba de VPH 16/18 Cervista™. Todas las pacientes que dieron su consentimiento para la realización del estudio fueron sometidas a colposcopias. Los investigadores y las pacientes estaban cegadas al estado de VPH de las pacientes hasta que finalizaron los procedimientos colposcópicos, para evitar sesgos. Las muestras histológicas dirigidas colposcópicamente fueron examinadas por patólogos que también desconocían la condición de VPH de las pacientes. Finalmente, se inscribieron en el estudio 1,514 mujeres a partir de los 18 años con resultados ASC-US de 89 clínicas en los Estados Unidos.

El rendimiento clínico de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ se comparó con los resultados histológicos y de la colposcopia. Se obtuvieron muestras de biopsia de las mujeres con citología ASC-US según lo requieren las normas sanitarias estándar en cada sitio clínico que participó del estudio. Los resultados histológicos consensuados brindados por un panel de revisión de patólogos central fueron el "criterio de referencia" para la determinación de la presencia o ausencia de la enfermedad. En ausencia de datos histológicos, la falta de lesiones cervicouterinas visibles mediante la colposcopia y de biopsia se equiparó a la ausencia de enfermedad.

Hubo 1,312 pacientes con ASC-US con estado de la enfermedad (histología central o colposcopia negativa) y resultados de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y la prueba de VPH 16/18 Cervista™ conocidos. Los resultados clínicos característicos de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ se muestran en las Tablas 9-15.

Tabla 9: Resultados de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ comparados con los resultados de colposcopia/histología central en mujeres con citología ASC-US

Resultado de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	**Resultado de la prueba de VPH 16/18 Cervista™**	**Enfermedad (histología central)**					**Total**
		Colposcopia neg. sin biopsia	**No presenta CIN**	**CIN1**	**CIN2**	**CIN3**	
VPH de alto riesgo positivo	**VPH 16 positivo**	39	83	40	25	14	201
	VPH 18 positivo	11	22	9	0	1	43
	VPH 16 y 18 positivos	1	3	5	2	2	13
	VPH 16 y 18 negativos	109	273	98	15	5	500
VPH de alto riesgo negativo	**VPH 16 ó 18 positivos**	3	3	1	0	0	7
	VPH 16 y 18 negativos	210	304	29	5	0	548
Total		373	688	182	47	22	1312

Entre las pacientes con resultados definitivos en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y datos del estado de la enfermedad, el porcentaje de resultados indeterminados en la prueba de VPH 16/18 Cervista™ en el estudio clínico de mujeres con citología ASC-US fue del 0% (0/1312) con un intervalo de confianza (IC) del 95%: de 0% a 0.3%.

Tabla 10: Resultados la prueba de VPH 16/18 Cervista™ comparados con los resultados de colposcopia/histología central (≥ CIN2) en mujeres con citología ASC-US

Resultado de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Resultado de la prueba de VPH 16/18 Cervista™	≥ CIN2		Total
		Positivo	Negativo	
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 positivo	39	162	201
	VPH 18 positivo	1	42	43
	VPH 16 y 18 positivos	4	9	13
	VPH 16 y 18 negativos	20	480	500
VPH de alto riesgo negativo	VPH 16 ó 18 positivos	0	7	7
	VPH 16 y 18 negativos	5	543	548
Total		69	1243	1312

Tabla 11: Riesgos de ≥ CIN2 para diferentes resultados de las pruebas de VPH de alto riesgo Cervista™ y de VPH 16/18 Cervista™

Prevalencia de ≥ CIN2: 5.3%

Resultado de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Resultado de la prueba de VPH 16/18 Cervista™	Riesgo	Intervalo de confianza del 95%		Índice de probabilidades	Intervalo de confianza del 95%	
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 ó 18 positivos	17.1% (44/257)	13.0%	22.2%	3.72	2.93	4.54
	VPH 16 y 18 negativos	4.0% (20/500)	2.6%	6.1%	0.75	0.51	1.06
VPH de alto riesgo negativo	VPH 16/18 negativos o positivos	0.9% (5/555)	0.4%	2.1%	0.17	0.07	0.36

Tabla 12: Resultados de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ para mujeres con resultado positivo en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™:

Prevalencia de ≥ CIN2 en mujeres con resultados positivos en la prueba de VPH Cervista™: 8.5%

		Intervalo de confianza del 95%
Sensibilidad	68.8% (44/64)	56.6% a 78.8%
Especificidad	69.3% (480/693)	65.7% a 72.6%

Tabla 13: Rendimiento de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ comparados con los resultados de colposcopia/histología central (≥ CIN3) en mujeres con citología ASC-US

Resultado de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Resultado de la prueba de VPH 16/18 Cervista™	≥ CIN3		Total
		Positivo	Negativo	
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 positivo	14	187	201
	VPH 18 positivo	1	42	43
	VPH 16 y 18 positivos	2	11	13
	VPH 16 y 18 negativos	5	495	500
VPH de alto riesgo negativo	VPH 16 ó 18 positivos	0	7	7
	VPH 16 y 18 negativos	0	548	548
Total		22	1290	1312

Tabla 14: Riesgo de ≥ CIN3 para diferentes resultados de las pruebas de VPH de alto riesgo Cervista™ y de VPH 16/18 Cervista™

Prevalencia de ≥ CIN3: 1.7%

Resultado de la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™	Resultado de la prueba de VPH 16/18 Cervista™	Riesgo	Intervalo de confianza del 95%		Índice de probabilidades	Intervalo de confianza del 95%	
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 ó 18 positivos	6.6% (17/257)	4.2%	10.3%	4.15	2.99	5.08
	VPH 16 y 18 negativos	1.0% (5/500)	0.4%	2.3%	0.59	0.26	1.14
VPH de alto riesgo negativo	VPH 16/18 positivos o negativos	0.0% (0/555)	0.0%	0.7%	0.00	0.00	0.37

Tabla 15: Rendimiento de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ para mujeres con resultado positivo en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™:

Prevalencia de ≥ CIN3 en pacientes con resultados positivos en la prueba de VPH Cervista™: 2.9%

		Intervalo de confianza del 95%
Sensibilidad	77.3%(17/22)	56.6% a 89.9%
Especificidad	67.3%(495/735)	63.9% a 70.6%

Tabla 16: Rendimiento de la prueba clínica de VPH 16/18 Cervista™ estratificado por edad para mujeres con resultados positivos en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™

		Histología central ≥ CIN2		
Edad: 18 a < 21		**Positivo**	**Negativo**	**Total**
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 y/o 18 positivos	7	39	46
	VPH 16 y 18 negativos	2	54	56
VPH de alto riesgo negativo		0	23	23
	Total	9	116	125
Prevalencia de la enfermedad*:	8.8% (9/102)	intervalo de confianza del 95%		
Sensibilidad:	77.8% (7/9)	40.0% a 97.2%		
Especificidad:	58.1% (54/93)	47.4% a 68.22%		
Edad: 21 a < 30		**Positivo**	**Negativo**	**Total**
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 y/o 18 positivos	21	117	138
	VPH 16 y 18 negativos	9	197	206
VPH de alto riesgo negativo		0	138	138
	Total	30	452	482
Prevalencia de la enfermedad*:	8.7% (30/344)	intervalo de confianza del 95%		
Sensibilidad:	70.0% (21/30)	50.6% a 85.3%		
Especificidad:	62.7% (197/314)	57.1% a 68.1%		
Edad: 30 a < 39		**Positivo**	**Negativo**	**Total**
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 y/o 18 positivos	7	30	37
	VPH 16 y 18 negativos	3	126	129
VPH de alto riesgo negativo		3	125	128
	Total	13	281	294
Prevalencia de la enfermedad*:	6.0% (10/166)	intervalo de confianza del 95%		
Sensibilidad:	70.0% (7/10)	34.8% a 93.3%		
Especificidad:	80.8% (126/156)	73.7% a 86.6%		
Edad: a partir de 39 años		**Positivo**	**Negativo**	**Total**
VPH de alto riesgo positivo	VPH 16 y/o 18 positivos	9	27	36
	VPH 16 y 18 negativos	6	103	109
VPH de alto riesgo negativo		2	264	266
	Total	17	394	411
Prevalencia de la enfermedad*:	10.3% (15/145)	intervalo de confianza del 95%		
Sensibilidad:	60.0% (9/15)	32.3% a 83.7%		
Especificidad:	79.2% (103/130)	71.2% a 85.8%		

* Prevalencia de ≥ CIN2 en mujeres con resultados positivos en la prueba de VPH Cervista™

A PARTIR DE LOS 30 AÑOS EN MUJERES CON CITOLOGÍA NILM, EL RENDIMIENTO DE LA PRUEBA DE VPH 16/18 CERVISTA™ COMO PRUEBA ADICIONAL DE VPH PARA GUIAR EL TRATAMIENTO DE LA PACIENTE

Se inició un estudio longitudinal de tres años de duración, posterior a la aprobación, para avalar el uso de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ como prueba adicional en mujeres a partir de los 30 años con citología normal y resultados positivos en la prueba de VPH de alto riesgo. El diseño del estudio se describe a continuación junto con datos analíticos preliminares

obtenidos de la población del estudio al momento del ingreso. Este estudio analítico se utilizó para evaluar la coincidencia de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ con secuenciación de ADN como comparador para la detección de VPH en las poblaciones con ASC-US y NILM ≥ 30. La aprobación para esta indicación se otorga antes de la finalización de los estudios longitudinales al conocerse los resultados de los estudios analíticos. Además, los datos constantes obtenidos de múltiples estudios transversales y prospectivos de cohortes realizados con diversos métodos de muestreo celular y diversos métodos de prueba de ADN de VPH (ambos aprobados por la FDA y aptos para uso en investigación) proporcionan pruebas sólidas de que una prueba del ADN de VPH negativa implica un riesgo muy bajo de CIN2-3 o cáncer diagnosticado o incipiente cuando la citología cervicouterina es normal.[5,8,12,23] Además, la ausencia de VPH 16/18 en esta población de mujeres reduce aún más el riesgo de desarrollar una enfermedad cervicouterina y, por otra parte, la presencia de VPH 16 ó VPH 18 aumenta el riesgo relativo de desarrollar una enfermedad cervicouterina en mujeres de ≥ de 30 años, independientemente de los hallazgos citológicos NILM.[10,11,13,24]

Descripción del estudio clínico de NILM ≥ 30

Se inscribieron aproximadamente 2,000 pacientes pacientes que cumplían los requisitos y con resultados de la prueba de Papanicolau normales (NILM) de 26 centros clínicos activos en los Estados Unidos. Se anticipa que no menos de 1,000 pacientes contarán con datos de seguimiento de 3 años. El índice de retención de pacientes al final del primer año de seguimiento fue de aproximadamente un 80%. Durante 3 años, se realizará un seguimiento de las pacientes, que deberán acudir a consultas anuales para la realización de análisis. En cada consulta de seguimiento, se realiza una prueba citológica cervicouterina. Se realizará una colposcopia a las mujeres que presentan resultados ASC-US o citología de mayor grado y subsiguientemente una biopsia, de ser necesario. El análisis de estos datos se centrará en el riesgo de desarrollar una enfermedad cervicouterina en un período de tres años asociado con las pacientes con resultados NILM positivos para la prueba de VPH 16/18 Cervista™ en comparación con las pacientes con resultados negativos en el momento del ingreso al estudio (T_0) y también el riesgo de desarrollar una enfermedad cervicouterina en un período de tres años asociado con las pacientes con resultados NILM positivos para la prueba de VPH 16/18 Cervista™ en comparación con las pacientes con resultados negativos para cualquier tipo de VPH de alto riesgo en el momento del ingreso al estudio (T_0). La presencia o ausencia de VPH en el momento del ingreso al estudio (T_0) se comparará con la presencia o ausencia de (a) > CIN2 y (b) > CIN3 durante el estudio. La presencia de CIN2, CIN3 o cáncer cervicouterino se determinará mediante una histología central. Los resultados negativos se definirán por la colposcopia a menos que los resultados histológicos centrales estén disponibles para dejar sin efecto una indicación colposcópica inicial positiva. Toda interpretación citológica será realizada por un panel de revisión de patólogos central.

Comparación de secuenciación de ADN y la prueba de VPH 16/18 Cervista™ para las poblaciones con ASC-US y NILM ≥ 30

Las muestras de ADN residuales de las pacientes con ASC-US y con NILM se utilizaron para la amplificación y secuenciación para la PCR. Las muestras de ADN se amplificaron mediante cebadores de consenso para el gen L1 del VPH. También se multiplicó una porción del gen de la beta-globina humana como control interno. Se usaron amplicones purificados como plantillas en las reacciones de secuenciación múltiple para 14 tipos de VPH de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Los datos de secuenciación se analizaron mediante distintos software de alineación de secuencias.

A continuación se presenta una comparación entre la prueba de VPH 16/18 Cervista™ y la secuenciación de ADN para la detección de VPH 16 y 18 en poblaciones con ASC-US y con NILM ≥ 30:

Tabla 17: Rendimiento de la prueba VPH 16/18 Cervista™ y resultados de la secuenciación para PCR, NILM ≥ 30

	Secuenciación para PCR										
Resultado de la prueba Cervista™	**Alto riesgo Indeterminado**	**Alto riesgo Negativo**	**Un tipo de alto riesgo**			**Dos tipos de alto riesgo**				**Mult. tipos de alto riesgo**	**Total**
			16	**18**	**Otro**	**16&18**	**16 y otro**	**18 y otro**	**Otros**	**16 y otro**	
VPH de alto riesgo positivo											
VPH 16 positivo	1	48	8	0	6	0	2	0	0	1	66
VPH 18 positivo	0	2	0	6	0	0	0	0	0	0	8
VPH 16 y 18 positivo	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
VPH 16 y 18 negativos	12	203	1	0	60	0	0	0	3	0	279
VPH de alto riesgo negativo											
VPH 16 positivo	0	12	1	0	0	0	0	0	0	0	13
VPH 18 positivo	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
VPH 16 y 18 negativos	39	1512	2	0	6	0	0	0	0	0	1559
Total	52	1784	12	6	73	0	2	0	3	1	1933

Entre las pacientes con resultados definitivos en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y muestras de secuenciación para PCR, el porcentaje de resultados de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ para las mujeres con citología NILM fue del 0% (0/1933) con un IC del 95%: de 0% a 0.2%.

Tabla 18: Comparación de los resultados de la prueba de VPH 16 Cervista™ o VPH 18 con los resultados de la secuenciación para PCR para las mujeres con resultados positivos en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, NILM ≥ 30

	Secuenciación para PCR de alto riesgo positiva VPH 16 ó VPH 18		**Total**
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ positiva:	**Positivo**	**Negativo**	
Prueba de VPH 16 y/o 18 Cervista™ positiva	17	58	75
Prueba de VPH 16 y/o 18 Cervista™ negativa	1	266	267
Total	18	324	342

Coincidencia porcentual positiva y coincidencia porcentual negativa

Coincidencia	**Porcentaje**	**Intervalo de confianza del 95%**	
Coincidencia porcentual positiva	94.4% (17/18)	74.2%	99.0%
Coincidencia porcentual negativa	82.1% (266/324)	77.6%	85.9%

Tabla 19: Rendimiento de la prueba VPH 16/18 Cervista™ y resultados de la secuenciación para PCR, ASC-US

	Secuenciación para PCR													
Resultado de la prueba Cervista™	**Alto riesgo IND**	**Alto riesgo NEG.**	**Un tipo de alto riesgo**			**Dos tipos de alto riesgo**				**Múltiples tipos de alto riesgo**				**Total**
			16	**18**	**Otro**	**16 & 18**	**16 y otro**	**18 y otro**	**Otros**	**16 y 18 y otro**	**16 y otro**	**18 y otro**	**Otros**	
VPH de alto riesgo positivo														
VPH 16 positivo	7	25	96	0	41	0	29	0	1	0	6	0	0	205
VPH 18 positivo	0	0	0	27	7	0	0	9	0	0	0	0	0	43
VPH 16 y 18 positivo	0	1	2	0	1	2	1	1	0	3	0	1	1	13
VPH 16 y 18 negativo	32	95	6	2	335	0	1	0	27	0	2	0	3	503
VPH 16 y/o 18 indefinido	2	1	0	0	7	0	0	0	2	0	0	0	0	12
VPH de alto riesgo negativo														
VPH 16 positivo	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
VPH 16 y 18 negativo	35	510	9	0	10	0	0	0	1	0	0	0	0	565
VPH 16 ó 18 indefinido	1	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Total	78	640	115	29	402	2	31	10	31	3	8	1	4	1354

Entre las pacientes con resultados definitivos en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ y muestras de secuenciación para PCR, el porcentaje de resultados de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ indeterminada para mujeres con citología ASC-US fue del 1.4% (19/1354) con un IC del 95%: de 0.9% a 2.2%.

Tabla 20: Comparación de los resultados de la prueba de VPH 16 Cervista™ o VPH 18 con los resultados de la secuenciación para PCR para las mujeres con resultados positivos en la prueba de VPH de alto riesgo Cervista™, ASC-US

	Secuenciación para PCR de alto riesgo positiva VPH 16 ó VPH 18		**Total**
Prueba de VPH de alto riesgo Cervista™ positiva:	**Positivo**	**Negativo**	
Prueba de VPH 16 y/o 18 Cervista™ positiva	177	77	254
Prueba de VPH 16 y 18 Cervista™ negativa	11	460	471
Total	188	537	725

Coincidencia porcentual positiva y coincidencia porcentual negativa

Coincidencia	**Porcentaje**	**IC del 95% para el puntaje**	
Coincidencia porcentual positiva	94.1% (177/188)	89.8%	96.7%
Coincidencia porcentual negativa	85.7% (460/537)	82.4%	88.4%

Sensibilidad analítica

El ADN plasmídico de VPH clonado, que representa los tipos 16 y 18 de VPH detectados por la prueba de VPH 16/18 Cervista™, se analizó para determinar la sensibilidad analítica de las pacientes para cada tipo específico.

Nueve muestras de ADN caracterizado como VPH negativo aisladas de las muestras cervicouterinas se analizaron en réplicas de ocho (9 muestras por 8 réplicas/muestra = 72 puntos de datos) para determinar el límite del blanco (LoB). Los valores LoB (FOZ del FAM) fueron 1.18 y 1.21 de VPH 16 y VPH 18 respectivamente.

El límite de detección (LoD) es la concentración más baja de analito presente en una muestra que presenta los resultados de la prueba como "VPH 16 ó VPH 18 detectado" al menos el 95% de las veces (los resultados de la prueba están por encima del valor de corte analítico el 95% de las veces). Se calcularon los valores del límite de detección (LoD) individual para ambos tipos de VPH (16, 18). Cada ADN plasmídico de VPH se analizó en concentraciones de 5000, 2500, 1250 y 625 copias por reacción, cada una en un fondo de tres concentraciones de ADN genómico aisladas de una línea celular negativa para VPH (10 ng, 100 ng y 1 μg por reacción). Todas las muestras positivas se analizaron en réplicas de ocho, que resultaron en 24 réplicas por concentración de ADN plasmídico del VPH.

El LoB y el LoD se evaluaron según el documento EP17-A del CLSI.[25]

El límite de detección para cada tipo de VPH se muestra en la Tabla 21. Los límites se describen en términos del FOZ del FAM y como un rango de la cantidad de copias. Los valores LoD de la cantidad de copias por reacción se informaron como el rango de la cantidad de copias en el cual el 95% de los valores FOZ del FAM observados estaban por encima del LoB.

Tabla 21: Resumen del análisis de sensibilidad de la prueba de VPH 16/18 Cervista™

Tipo de ADN del VPH	LoD (Cantidad de copias/reacción)	LoD (FOZ del FAM)	Desviación estándar
16	625-1250	1.34	0.10
18	625-1250	1.33	0.07

Además del estudio de sensibilidad analítica descrito anteriormente, se prepararon las diluciones de la línea de células para evaluar el rendimiento del análisis de VPH 16/18 con dos líneas de células VPH positivas (HeLa y SiHa) diluidas con una línea de células VPH negativas (Jurkat) en una concentración final de 100,000 células/ml en el medio PreservCyt. Se aisló el ADN de las muestras de la línea de células mediante el kit de extracción de ADN Genfind™. Con un valor de corte de FOZ clínico para VPH 16 y VPH 18 de 2.13, las concentraciones de aproximadamente 2,500 células/ml para las células SiHa y HeLa estuvieron por encima del corte clínico el 95% de las veces.

Valor de corte clínico de la prueba de VPH 16/18 Cervista™

El valor de corte clínico se evaluó sobre la base de los resultados de la prueba de VPH 16/18 con el objetivo de una tasa positiva del 5% en la población con NILM ≥ 30 de un estudio clínico multicéntrico. Se determinó el percentil 95° de los valores máximos FOZ del VPH 16 y VPH 18 para las pacientes con NILM ≥ 30 y, sobre la base de este análisis, se seleccionó un valor FOZ ≥ 2.13 como el valor de corte positivo para la prueba de VPH 16 y VPH 18 Cervista™.

Precisión

La repetibilidad y la precisión intralaboratorio de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ se demostraron en un estudio de 21 días de duración con tres operadores alternantes y cada uno realizó dos análisis por día en equipos asignados de forma individual. Cada los análisis consistió en una placa. Se usaron diseños de placas diferentes para los análisis en cada día. El procedimiento siguió las normas EP5-A2 del CLSI.

Cada análisis consistió en muestras de ADN genómico aisladas de dos líneas de células VPH positivas (SiHa, tipo 16 y HeLa, tipo 18), una línea de células VPH negativas (Jurkat) y muestras artificiales que contenían ADN plasmídico de VPH 16 y VPH 18 y ADN de Jurkat. Cada muestra se analizó por duplicado. La cantidad total de mediciones por muestra fue de 84 (21 días, 2 análisis por día, 2 réplicas por análisis).

Se calcularon los valores de repetibilidad y precisión intralaboratorio para cada objetivo en cada concentración. Los valores de precisión para el FOZ del VPH 16 se muestran en la Tabla 22 y los valores para el FOZ del VPH 18 se muestran en la Tabla 23. En las Tablas 24 y 25 se presenta un resumen de los resultados positivos para VPH 16 y positivos para VPH 18, respectivamente.

Tabla 22: Valores de precisión de VPH 16 para cada objetivo y concentración

Objetivo	Copias/reacción[a] o células/ml[b]	N	Media de FOZ del VPH 16	Intraanálisis (repetibilidad)		Interserial		Interdiaria		Interoperador		Total (precisión intralaboratorio)	
				DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%
VPH 16	5,000[a]	84	3.708	0.196	5%	0.238	6%	0.348	9%	0.364	10%	0.411	11%
	20,000[a]	84	7.397	0.697	9%	0.460	6%	0.390	5%	0.331	4%	0.708	10%
VPH 18	5,000[a]	84	1.021	0.028	3%	0.042	4%	0.031	3%	0.027	3%	0.047	5%
	20,000[a]	84	1.024	0.041	4%	0.069	7%	0.045	4%	0.048	5%	0.073	7%
SiHa/ Jurkat	5,000 SiHa/ 95,000 Jurkat[b]	84	2.430	0.160	7%	0.115	5%	0.138	6%	0.135	6%	0.196	8%
	20,000 SiHa/ 80,000 Jurkat[b]	84	5.465	0.220	4%	0.360	7%	0.384	7%	0.324	6%	0.486	9%
Hela/ Jurkat	2,500 HeLa/ 97,500 Jurkat[b]	84	0.784	0.029	4%	0.047	6%	0.049	6%	0.048	6%	0.063	8%
	10,000 HeLa/ 90,000 Jurkat[b]	84	0.893	0.037	4%	0.037	4%	0.039	4%	0.036	4%	0.053	6%
Jurkat	10,000[b]	84	0.886	0.111	12%	0.074	8%	0.064	7%	0.029	3%	0.114	13%
	20,000[b]	84	0.870	0.029	3%	0.035	4%	0.030	3%	0.023	3%	0.044	5%
	100,000[b]	84	0.917	0.066	7%	0.042	5%	0.042	5%	0.039	4%	0.070	8%

[a] ADN plasmídico de VPH 16 ó VPH 18 en la concentración indicada (copias/reacción) mezclado con 100 ng/reacción de ADN genómico negativo para VPH (Jurkat).

[b] ADN genómico aislado de células VPH positivas (SiHa y HeLa) o células VPH negativas (Jurkat) en la concentración indicada (células/ml).

Tabla 23: Valores de precisión de VPH 18 para cada objetivo y concentración

Objetivo	Copias/reacción o células/ml[b]	N	Media de FOZ del VPH 18	Intraanálisis (repetibilidad)		Interserial		Interdiaria		Interoperador		Total (precisión intralaboratorio)	
				DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%
VPH 16	5,000[a]	84	0.978	0.041	4%	0.055	6%	0.059	6%	0.050	5%	0.076	8%
	20,000[a]	84	0.990	0.055	6%	0.068	7%	0.062	6%	0.043	4%	0.087	9%
VPH 18	5,000[a]	84	3.620	0.243	7%	0.255	7%	0.265	7%	0.230	6%	0.363	10%
	20,000[a]	84	8.483	0.396	5%	0.613	7%	0.595	7%	0.378	4%	0.787	9%
SiHa/ Jurkat	5,000 SiHa/ 95,000 Jurkat [b]	84	0.874	0.051	6%	0.035	4%	0.045	5%	0.043	5%	0.062	7%
	20,000 SiHa/ 80,000 Jurkat [b]	84	0.858	0.023	3%	0.052	6%	0.043	5%	0.044	5%	0.059	7%
Hela/ Jurkat	2,500 HeLa/9 97,500 Jurkat[b]	84	2.988	0.163	5%	0.174	6%	0.175	6%	0.064	2%	0.243	8%
	10,000 HeLa/ 90,000 Jurkat[b]	84	7.918	0.427	5%	1.466	19%	1.757	22%	0.463	6%	2.062	26%
Jurkat	10,000[b]	84	0.927	0.055	6%	0.054	6%	0.055	6%	0.043	5%	0.077	8%
	20,000[b]	84	0.920	0.035	4%	0.038	4%	0.035	4%	0.027	3%	0.051	6%
	100,000[b]	84	0.951	0.054	6%	0.042	4%	0.036	4%	0.031	3%	0.060	6%

[a] ADN plasmídico de VPH 16 ó VPH 18 en la concentración indicada (copias/reacción) mezclado con 100 ng/reacción de ADN genómico negativo para VPH (Jurkat).

[b] ADN genómico aislado de células VPH positivas (SiHa y HeLa) o células VPH negativas (Jurkat) en la concentración indicada (células/ml).

Tabla 24: Resumen de los resultados positivos para VPH 16 para el estudio de precisión.

Objetivo	Copias/reacción[a] o células/ml[b]	N	Media de FOZ del VPH 16	Porcentual de VPH 16 positivo (n.º)			
				Operador 1	Operador 2	Operador 3	Total
VPH 16	5,000[a]	84	3.708	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	20,000[a]	84	7.397	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
VPH 18	5,000[a]	84	1.021	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	20,000[a]	84	1.024	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
SiHa/Jurkat	20,000 SiHa/ 80,000 Jurkat [b]	84	2.430	82% (23)	100% (28)	100% (28)	94% (79)
	5,000 SiHa/ 95,000 Jurkat [b]	84	5.465	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
Hela/Jurkat	2,500 HeLa/ 97,500 Jurkat[b]	84	0.784	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	10,000 HeLa/ 90,000 Jurkat[b]	84	0.893	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Jurkat	10,000[b]	84	0.886	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	20,000[b]	84	0.870	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	100,000[b]	84	0.917	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

[a] ADN plasmídico de VPH 16 ó VPH 18 en la concentración indicada (copias/reacción) mezclado con 100 ng/reacción de ADN genómico negativo para VPH (Jurkat).

[b] ADN genómico aislado de células VPH positivas (SiHa y HeLa) o células VPH negativas (Jurkat) en la concentración indicada (células/ml).

Tabla 25: Resumen de los resultados positivos para VPH 18 para el estudio de precisión.

Objetivo	Copias/reacción[a] o células/ml[b]	N	Media de FOZ del VPH 18	Porcentaje de VPH 18 positivo (n.º)			
				Operador 1	Operador 2	Operador 3	Total
VPH 16	5,000[a]	84	0.978	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	20,000[a]	84	0.990	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
VPH 18	5,000[a]	84	3.620	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	20,000[a]	84	8.483	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
SiHa/Jurkat	5,000 SiHa/ 95,000 Jurkat[b]	84	0.874	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	20,000 SiHa/ 80,000 Jurkat[b]	84	0.858	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
Hela/Jurkat	2,500 HeLa/ 97,500 Jurkat[b]	84	2.988	100% (28)	100% (28)	100% (28)	100% (84)
	10,000 HeLa/ 90,000 Jurkat[b]	84	7.918	100% (28)	100% (28)	86% (24)	95% (80)
Jurkat	10,000[b]	84	0.927	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	20,000[b]	84	0.920	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	100,000[b]	84	0.951	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

[a] ADN plasmídico de VPH 16 ó VPH 18 en la concentración indicada (copias/reacción) mezclado con 100 ng/reacción de ADN genómico negativo para VPH (Jurkat).

[b] ADN genómico aislado de células VPH positivas (SiHa y HeLa) o células VPH negativas (Jurkat) en la concentración indicada (células/ml).

Reproducibilidad

La reproducibilidad de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ se evaluó en tres sitios externos mediante un panel de células cultivadas positivas y negativas para VPH y muestras cervicouterinas positivas y negativas para VPH. El ADN se extrajo de 2 ml de muestra cervicouterina o células cultivadas suspendidas en solución PreservCyt®. El ADN se extrajo mediante el kit de extracción de ADN Genfind™. Se extrajo el ADN de 16 muestras y se analizó con la prueba de VPH 16/18 Cervista™ en tres sitios durante cinco días no consecutivos dentro de un período de dos semanas. Se utilizaron dos lotes de kits de la prueba de VPH 16/18 Cervista™ y tres lotes de Kits de extracción de ADN Genfind™ en tres sitios del estudio. La cantidad total de mediciones para cada muestra fue 15 (= 3 sitios x 5 días x 1 análisis por día). En la Tabla 26 se muestra un resumen de la coincidencia porcentual entre los resultados previstos y observados, combinados para todos los sitios. En la Tabla 27 y la Tabla 28 se presenta un resumen de los resultados de las muestras individuales en los sitios con una media acumulada, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para los valores FOZ del VPH 16 y el VPH 18.

Tabla 26: Resumen de los datos del estudio de reproducibilidad multicéntrico de la prueba de VPH 16 /18 Cervista™.

Resultado previsto	Cantidad de resultados	Resultados coincidentes	Coincidencia porcentual	Límite inferior del intervalo de confianza del 95%
Positivo	150	150	100.0%	97.5%
Negativo	90	90	100.0%	95.9%

Tabla 27: Resumen de los resultados de la prueba de VPH 16 Cervista™ de un estudio multicéntrico de reproducibilidad

Muestra	Tipo y concentración de la muestra (células/ml)	N	FOZ del VPH 16		Porcentual de VPH 16 positivo (n.º)			
			Media	Desviación estándar	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Total (n.°)
1. Neg.	100,000 Jurkat	15	0.899	0.048	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
2. Pos.: VPH 18	10,000 HeLa 90,000 Jurkat	15	0.883	0.076	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
3. Pos.: VPH 18	5,000 HeLa 95,000 Jurkat	15	0.847	0.083	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
4. Pos.: VPH 18	2,500 HeLa 97,500 Jurkat	15	0.833	0.073	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
5. Pos.: VPH 16	20,000 SiHa 80,000 Jurkat	15	6.345	0.553	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
6. Pos.: VPH 16	10,000 SiHa 90,000 Jurkat	15	4.933	0.598	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
7. Pos.: VPH 16	5,000 SiHa 95,000 Jurkat	15	3.049	0.473	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
8. Pos.: VPH 18 y VPH 16	5,000 SiHa 2,500 HeLa 12,500 Jurkat	15	3.047	0.387	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
9. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.905	0.078	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
10. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.888	0.097	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
11. Pos.: VPH 18	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.958	0.154	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
12. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.865	0.127	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
13. VPH 16	Combinación de muestras cervicouterinas	15	9.769	0.658	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
14. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.919	0.093	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
15. VPH 16	Combinación de muestras cervicouterinas	15	2.782	0.611	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
16. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	1.049	0.130	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0

Tabla 28: Resumen de los resultados de la prueba de VPH 18 Cervista™ de un estudio multicéntrico de reproducibilidad

Muestra	Tipo y concentración de la muestra (células/ml)	N	FOZ del VPH 18		Porcentaje de VPH 18 positivo (n.º)			
			Media	Desviación estándar	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Total
1. Neg.	100,000 Jurkat	15	0.927	0.042	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
2. Pos.: VPH 18	10,000 HeLa 90,000 Jurkat	15	9.322	0.831	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
3. Pos.: VPH 18	5,000 HeLa 95,000 Jurkat	15	6.121	1.105	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
4. Pos.: VPH 18	2,500 HeLa 97,500 Jurkat	15	3.645	0.455	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
5. Pos.: VPH 16	20,000 SiHa 80,000 Jurkat	15	0.831	0.043	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
6. Pos.: VPH 16	10,000 SiHa 90,000 Jurkat	15	0.963	0.043	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
7. Pos.: VPH 16	5,000 SiHa 95,000 Jurkat	15	0.927	0.031	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
8. Pos.: VPH 18 y VPH 16	5,000 SiHa 2,500 HeLa 12,500 Jurkat	15	3.815	0.435	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
9. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.896	0.049	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
10. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.892	0.053	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
11. Pos.: VPH 18	Combinación de muestras cervicouterinas	15	10.413	1.945	100 (5)	100 (5)	100 (5)	15
12. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	1.146	0.121	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
13. VPH 16	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.861	0.053	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
14. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.927	0.029	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
15. VPH 16	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.921	0.035	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
16. Neg.	Combinación de muestras cervicouterinas	15	0.921	0.050	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0

Sustancias interferentes

Se analizaron tres muestras de líneas celulares (una negativa para VPH, una positiva para VPH 16 y una positiva para VPH 18) descritas en la Tabla 29 con interferentes que podrían estar presentes en la muestra cervicouterina o pudieron transferirse de manera inadvertida durante la extracción de la muestra mediante el kit de extracción de ADN Genfind™ (Tabla 30). Los niveles de concentración se seleccionaron de modo que representaran las condiciones extremas que podrían presentarse durante la obtención de

la muestra si el cuello uterino no se limpiase antes de realizar el procedimiento. El ADN se aisló de las muestras puras e impuras mediante el kit de extracción de ADN Genfind™ y se analizó con la prueba de VPH 16/18 Cervista™ para evaluar la interferencia producida por las sustancias introducidas.

Tabla 29: Descripciones de las muestras de las sustancias interferentes

Muestra	Descripción
Jurkat	Muestra de línea celular almacenada en solución PreservCyt que contiene 100,000 células/ml de células Jurkat (negativas para VPH)
SiHa/Jurkat	Muestra de línea celular almacenada en solución PreservCyt que contiene 7,500 células/ml de células SiHa (positivas para VPH 16) y 92,500 células/ml de células Jurkat
HeLa/Jurkat	Muestra de línea celular almacenada en solución PreservCyt que contiene 2,500 células/ml de células HeLa (positivas para VPH 18) y 97,500 células/ml de células Jurkat

Tabla 30: Resultados de la interferencia

Sustancias interferentes		Concentraciones analizadas	¿Se observa interferencia?
Fuente	**Tipo**		
Muestra de células cervicouterinas	Sangre	Detectable visualmente	No
	Mucosa	Detectable visualmente	No
	Sangre/mucosa	Detectable visualmente	No
	Irrigación vaginal	0.5%, 2%	No
	Jalea anticonceptiva	0.5%, 2%	Sí [a]
	Crema antimicótica con 2% de clotrimazol	0.5%, 2%	Sí [a]
	Crema antimicótica con 4% de miconazol	0.5%, 2%	Sí [a]
Kit de extracción de ADN Genfind™ Procesamiento de la muestra	Solución PreservCyt®	0.5%, 2%	No
	70% de etanol	5%, 10%	No
	Microesferas magnéticas	5%, 10%	No

[a]Los niveles de sustancias interferentes requeridos para producir fallas en las pruebas (2%) son inusualmente elevados y no deben encontrarse en las muestras clínicas reales.

Durante la extracción del ADN, la jalea anticonceptiva mostró una interferencia visualmente detectable con la separación de microesferas magnéticas en 10 mM de amortiguador Tris, lo que produjo una recuperación baja de ADN y una muestra insuficiente de ADN para realizar la prueba.

Los niveles de sustancia interferente requeridos para provocar fallas en las pruebas son inusualmente elevados y no deben encontrarse en las muestras clínicas reales si el médico sigue el procedimiento de muestreo citológico cervicouterino correspondiente, que consiste en limpiar el cuello uterino antes de obtener la muestra de células para la citología cervicouterina.

Reactividad cruzada

Se analizó un panel bacteriano, micótico y vírico que habitualmente se encuentran en el tracto anogenital femenino y también se analizaron diversos tipos de virus de papiloma humano de riesgo alto, bajo o indefinido con la prueba de VPH 16/18 Cervista™ para evaluar una posible reactividad cruzada.

Tabla 31: Los microorganismos enumerados a continuación se agregaron a la solución PreservCyt® en concentraciones de aproximadamente 1 x10^5 cfu/ml y 1x10^7 cfu/ml. Se extrajo ADN de estos microorganismos y una línea celular negativa (Jurkat, 1x10^5 células/ml) mediante el kit de extracción de ADN Genfind™. Todas las muestras presentaron resultados negativos con la prueba de VPH 16/18 Cervista™.

Candida albicans	*Proteus vulgaris*
Corynebacterium pseudodiptheriticum	*Staphylococcus aureus*
Enterococcus faecalis	*Staphylococcus epideridis*
Escherichia coli	*Streptococcus mitis*
Lactobacillus acidophilus	*Streptococcus pyogenes*

Tabla 32: Se analizó el ADN purificado obtenido de los microorganismos enumerados a continuación en concentraciones de 1x10^5 copias/reacción y 1x10^7 copias/reacción mediante la prueba de VPH 16/18 Cervista™. Todas las muestras generaron resultados negativos.

Virus del herpes simple, tipo 1 (VHS-1)	*Chlamydia trachomatis*
Virus del herpes simple, tipo 2 (VHS-2)	*Neisseria gonorrhoeae*
Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1, regiones pol y env)	*Neisseria meningitides*
	Mycoplasma hominis

Tabla 33: Se analizó el ADN clonado o amplicones de PCR para las siguientes muestras en concentraciones de 1x10^5 copias/reacción y 1x10^7 copias/reacción a menos que se mencione lo contrario, mediante la prueba de VPH 16/18 Cervista™. Todas las muestras generaron resultados negativos.

Virus de papiloma humano tipo 1a	Virus de papiloma humano tipo 51
Virus de papiloma humano tipo 6	Virus de papiloma humano tipo 52
Virus de papiloma humano tipo 11	Virus de papiloma humano tipo 53
Virus de papiloma humano tipo 31[a]	Virus de papiloma humano tipo 58
Virus de papiloma humano tipo 35	Virus de papiloma humano tipo 59
Virus de papiloma humano tipo 39	Virus de papiloma humano tipo 66
Virus de papiloma humano tipo 42	Virus de papiloma humano tipo 67
Virus de papiloma humano tipo 43	Virus de papiloma humano tipo 68
Virus de papiloma humano tipo 44	Virus de papiloma humano tipo 70
Virus de papiloma humano tipo 45	Gen de control interno humano

[a]El virus de papiloma humano tipo 31 produjo resultados positivos para la prueba de VPH 16/18 Cervista™a 1X10^7 copias/reacción. Con una valoración adicional del VPH 31, se obtuvieron resultados negativos con la prueba de VPH 16/18 Cervista™ a ≤ 1x10^6 copias/reacción.

Se realizó un estudio adicional de reactividad cruzada de *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitides,* y *Mycoplasma hominis* mediante microorganismos completos añadidos a la solución PreservCyt® con células Jurkat negativas para VPH (100,000 células/ml). Se prepararon tres lotes de cada microorganismo y se aisló el ADN de todas las muestras mediante el kit de extracción de ADN Genfind™. Este estudio demostró que la prueba de VPH 16/18 Cervista™ no presenta reactividad cruzada con el ADN aislado de las muestras en PreservCyt® que contienen hasta 1.0x10^7 cfu/ml de *Neisseria meningitides y Mycoplasma hominis,* 5x10^6 cfu/ml de *Neisseria gonorrhoeae* y 1.0x10^6 cfu/ml *Chlamydia trachomatis*.

REFERENCIAS

1. Sitio Web de la American Society for Colposcopy and Cervical Pathology: www.asccp.org, 2008.
2. Sitio Web del National Cancer Institute: www.cancer.gov, 2008.
3. Meijer CJ, Snijders PJ, and Castle PE. 2006. Clinical utility of HPV genotyping. Gynecol Oncol 103: 12-17.
4. Winer RL, N Kiviat, J Hughes, D Adams, S Lee, J Kuypers, L Koutsky. 2005. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. J Infect Dis 191: 731-738.
5. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. 2001. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. JAMA 286: 3106-3114.
6. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2002. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. JAMA 287: 2120-2129.
7. Solomon D, Schiffman M, and Tarone R. 2001. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. Jour Nat Can Inst 93(4): 293-299.
8. Sherman ME, Schiffman M, and Cox TJ. 2002. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). Jour Nat Can Inst 94(2): 102-107.
9. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, and Mody DR. 2004. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the college of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. Arch Path Lab Med 128: 1224-1229.
10. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. J Natl Cancer Inst 97:1072-1079.
11. Castle PE et al 2005. Human Papillomavirus Type 16 Infections and 2-Year Absolute Risk of Cervical Precancer in Women With Equivocal or Mild Cytologic Abnormalities. J Natl Cancer Inst 97: 1066-1071.
12. Mayrand MH, E Duarte-Franco, I Rodrigues, SD Walter, J Hanley. 2007. A Ferenczy, S Ratnam, F Coutlée, EL Franco. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. N Engl J Med 357(16): 1579-1588.
13. Wheeler CM, WC Hunt, M Schiffman, PE Castle. 2006. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-Year risk of cervical cancer. J Infect Dis 194: 1291-1299.
14. Bosch X and Harper D. 2006. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. Gynecol Oncol 103(1): 21-24.
15. Bulkmans NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Snijders PJ, Meijer CJ; POBASCAM Study Group. 2007. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. Br J Cancer 96(9): 1419-1424.
16. Sandadi S, RL Flyckt, KM Zanotti. 2008. Cost effectiveness of a triage strategy for atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion cytology using human papillomavirus 16/18 genotyping. Gynecological Oncol 108(S96): 218.

17. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki A-B, Smith RA, Eyre HJ, Cohen C. 2002. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA Can Jour Clin 53: 342-362.
18. Wright TC, Jr., Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al. 2004. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. Obstet Gynecol 103: 304-309.
19. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, and Solomon D. 2007. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. Am J Obstet Gynecol 197(4): 346-355.
20. Castellsague X et al. 2006. Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention. J Natl Cancer Inst 98: 303-315.
21. Hall JG, Eis PS, Law SM, Reynaldo LP, Prudent JR, Marshall DJ, Allawi HT, Mast AL, Dahlberg JE, Kwiatkowski RW, de Arruda M, Neri BP, and Lyamichev VI. 2000. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. PNAS 97(15): 8272-8277.
22. Revzina N, DiClemente R. 2005. Prevalence and incidence of human papillomavirus infection in women in the USA: a systematic review. Int J of STD & AIDS 528-537.
23. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. Lancet 357(9271): 1831-1836.
24. Woodman CB, Collins S, Rollason TP, Winter H, Bailey A, Yates M, Young LS. 2003. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. 361(9351): 40-43.
25. CLSI document EP17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline

GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

TABLA 34: Guía de resolución de problemas

Observación	Causa probable	Soluciones
Volumen insuficiente para las mezclas de reacción	La cantidad de muestras ingresadas en la ficha "Assay Selection" (Selección del estudio) del software es menor que las muestras agregadas a la placa.	Vuelva a calcular en forma manual la cantidad requerida de mezcla de reacción necesaria para completar toda la placa.
		Vuelva a crear las copias de impresión del software usando la cantidad correcta de muestras.
	Se agregó un volumen de mezcla de reacción excesivo a la microplaca de 96 pocillos.	Verifique que se hayan agregado los volúmenes de mezcla hace correctos a cada pocillo.
		Verifique que la información de calibración del equipo esté actualizada.
El control negativo produce los siguientes resultados: • Aumento de la ganancia para el análisis 1 • Aumento de la ganancia para el análisis 2 • Aumento de la ganancia para ambos análisis	La configuración de la ganancia del lector de microplacas de fluorescencia es demasiado baja por lo que hace que los valores de las señales de fluorescencia desciendan por debajo del requisito mínimo.	Aumente la configuración de ganancia del del fluorómetro para los análisis designados de modo que el control negativo produzca una señal mínima de 600 RFU y vuelva a leer la placa.

Observación	Causa probable	Soluciones
Ocurren errores durante la importación de datos: "Verifique las configuraciones de resultados del FAM y el Red y lea toda la placa nuevamente. (No se permiten lecturas parciales de la placa.)" "Verifique la configuración de ganancia del FAM y lea toda la placa nuevamente. (No se permiten lecturas parciales de la placa.)" "Verifique la configuración de ganancia del Red y lea toda la placa nuevamente. (No se permiten lecturas parciales de la placa.)"	Problemas del fluorómetro	Consulte la Guía de resolución de problemas del Manual del usuario del software Invader Call Reporter™ para obtener información acerca de los problemas del fluorómetro que puedan ayudarlo a solucionar este error.
	El período de incubación térmica fue más extenso que el tiempo específico que se recomienda	Confirme que la incubación se haya realizado en el período y la temperatura especificados.

El control negativo produce los siguientes resultados: • Diferencia porcentual alta (control negativo de ADNg)	Mezcla de reactivos insuficiente o inconstante	• Asegúrese de que todos los reactivos, las muestras y las mezclas de reacción se mezclen completamente. • Al agregar una mezcla de reacción a cada pocillo, coloque las puntas en la parte inferior del pocillo (debajo del aceite mineral) y transfiera con la pipeta lentamente hacia arriba y hacia abajo 3 ó 4 veces. • Asegúrese de que se expulse todo el líquido de la punta de la pipeta durante las adiciones. • Verifique que se haya agregado el reactivo correcto a cada pocillo. • Verifique que se hayan agregado los volúmenes de mezcla de reactivos correctos a cada pocillo. • Verifique que la información de calibración del equipo esté actualizada. • Inspeccione visualmente la placa para verificar que haya un volumen equivalente entre los pocillos.
	Preparación incorrecta de las mezclas de reacción	
	Adición inconsistente del control negativo o la mezcla de reacción a la microplaca	
	Sospecha de contaminación durante la adición de la muestra o la preparación de la mezcla de reacción	Use puntas con barrera de aerosol sin nucleasa y tubos estériles cuando haga las mezclas de reacción.
		Use guantes durante la preparación de la prueba.
		Dado que puede haber nucleasas presentes, asegúrese de que las puntas de las pipetas no toquen ninguna otra superficie excepto la solución que se está preparando.
		No toque las puntas de las pipetas con las manos.
		Limpie las superficies con los materiales adecuados.
	Evaporación de la muestra	Compruebe que se haya agregado aceite mineral a cada pocillo.
	Burbujas en los pocillos de la reacción	De ser posible, centrifugue las placas antes de la prueba de fluorescencia.
	Las mezclas de reacción preparadas no se usaron dentro del período recomendado	Use las mezclas de reacción dentro de los 30 minutos de la preparación.

Los controles presentan el resultado "Invalid Control" (control inválido)	Mezcla de los controles insuficiente o inconstante	• Asegúrese de que todos los controles y reactivos se mezclen bien y de forma constante. • Al agregar una mezcla de reacción a cada pocillo, coloque las puntas en la parte inferior del pocillo (debajo del aceite mineral) y transfiera con la pipeta lentamente hacia arriba y hacia abajo 3 ó 4 veces. • Asegúrese de que se expulse todo el líquido de la punta de la pipeta durante las adiciones. • Asegúrese de que se haya agregado el control correcto a cada pocillo. • Asegúrese de que se haya agregado el volumen de control correcto a cada pocillo. • Revise la información de calibración del equipo. • Inspeccione visualmente la placa para verificar que haya un volumen equivalente entre los pocillos.
	Adición inconstante de la mezcla de reacción	
	Adición insuficiente o inconstante de control	
	No se agregaron los controles correctos a la placa o no se agregaron en la posición correcta de la placa	Verifique que se hayan agregado los controles correctos en las posiciones de la placa adecuadas.
	El período de incubación fue más corto o más extenso que el tiempo recomendado	Confirme que la incubación se haya realizado en el período y la temperatura especificados.
	Sospecha de contaminación durante la adición de la muestra	Use puntas con barrera de aerosol sin nucleasa y tubos estériles durante la configuración.
		Use guantes durante la preparación de la prueba.
		Asegúrese de que las puntas de las pipetas toquen sólo la solución que se administra.
		No toque las puntas de las pipetas con las manos.
		Limpie las superficies con los materiales adecuados.
	Evaporación de la muestra	Compruebe que se haya agregado aceite mineral a cada pocillo.
	Es posible que la placa no esté en la orientación correcta	Cuando analice la placa, oriéntela de manera que el pocillo A1 esté en la esquina superior izquierda.
	Burbujas en los pocillos de la reacción	De ser posible, centrifugue las placas antes de la prueba de fluorescencia.
	Las mezclas de reacción preparadas no se usaron dentro del período recomendado	Use las mezclas de reacción dentro de los 30 minutos de la preparación.

La muestra presenta un resultado de "IND: diferencia porcentual alta”	Mezcla de muestras insuficiente o inconstante Adición inconstante de la mezcla de reacción Adición inconstante de la muestra	Asegúrese de que todos los reactivos y las muestras se mezclen completamente.
		Al agregar una mezcla de reacción a cada pocillo, coloque las puntas en la parte inferior del pocillo (debajo del aceite mineral) y transfiera con la pipeta lentamente hacia arriba y hacia abajo 3 ó 4 veces.
		Asegúrese de que se expulse todo el líquido de la punta de la pipeta durante las adiciones.
		Verifique que se haya agregado la muestra correcta a cada pocillo.
		Verifique que se haya agregado el volumen correcto de la muestra a cada pocillo.
		Verifique que la información de calibración del equipo esté actualizada.
		Inspeccione visualmente la placa para verificar que haya un volumen equivalente entre los pocillos.
	Sospecha de contaminación durante la adición de la muestra	Use puntas con barrera de aerosol sin nucleasa y tubos estériles durante la configuración.
		Use guantes durante la preparación de la prueba.
		Asegúrese de que las puntas de las pipetas toquen sólo la solución que se administra.
		No toque las puntas de las pipetas con las manos.
		Limpie las superficies con los materiales adecuados.
	Evaporación de la muestra	Compruebe que se haya agregado aceite mineral a cada pocillo.
	Burbujas en los pocillos de la reacción	De ser posible, centrifugue las placas antes de la prueba de fluorescencia.
	Las mezclas de reacción preparadas no se usaron dentro del período recomendado	Use las mezclas de reacción dentro de los 30 minutos de la preparación.

La muestra presenta un resultado de "IND: ADNg bajo"	Cantidad insuficiente de células en la muestra	• Mezcle bien la muestra y repita la extracción de ADN para la muestra. • Verifique que se haya agregado el volumen correcto de la muestra a cada pocillo. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN.
	Sospecha de error durante la extracción de ADN	
	En la prueba, se utilizó una cantidad insuficiente de ADN	
	Inhibición de la muestra de ADN	Repita la extracción de ADN de la muestra.
		Consulte el anexo del paquete, en la sección Características de los resultados (Sustancias interferentes).
	Es posible que las muestras de ADN no se hayan desnaturalizado completamente	Asegúrese de que la muestra se haya desnaturalizado a la temperatura correcta y durante el tiempo adecuado.
La muestra presenta un resultado de "IND: FOZ del VPH bajo"	Sospecha de error durante la extracción de ADN	• Repita la extracción de ADN de la muestra. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN. • Consulte el anexo del paquete, en la sección Características de rendimiento (Sustancias interferentes).
	Inhibición de la muestra de ADN	
Volumen de ADN de la muestra insuficiente	Volumen de elución insuficiente durante la extracción de ADN	• Repita la extracción de ADN de la muestra. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN.
Cantidad alta de muestras de ADN con valores FOZ del FAM positivos en ambas mezclas de de reacción	Sospecha de error durante la extracción de ADN	• Repita la extracción de ADN de la muestra. • Verifique que se haya seguido el procedimiento correcto de extracción de ADN.
	Sospecha de contaminación del reactivo de extracción de ADN	

INFORMACIÓN DE CONTACTO

Fabricante:
Third Wave Technologies, Inc.
502 S. Rosa Road
Madison, WI, 53719 EE.UU.
Teléfono: 608.273.8933
Sitio Web: www.twt.com

Soporte técnico:
Third Wave Technologies, Inc.
Teléfono: 888.898.2357, opción 3

AVISO PARA EL DESTINATARIO ACERCA DE LA LICENCIA LIMITADA

La recepción de este producto de Third Wave Technologies, Inc. o su distribuidor autorizado incluye una licencia limitada no exclusiva conforme a los derechos de patente de Third Wave Technologies, Inc. La adquisición de este producto constituye la aceptación de la licencia limitada por parte del destinatario. Los destinatarios que no deseen aceptar la licencia limitada deberán devolver el producto para obtener un reembolso completo. Dicha licencia tiene el único propósito de usar este producto para detectar un analito específico. Para evitar dudas, la licencia anterior no incluye derechos de uso de este producto para aplicaciones agrícolas o veterinarias. La anterior licencia no incluye una licencia de uso del producto para nuevas investigaciones o desarrollos, fabricación del producto ni objetivo alguno de ingeniería inversa. El comprador de este producto no está autorizado a transferirlo a terceros, con ningún fin, sin el consentimiento expreso por escrito de Third Wave Technologies, Inc. A excepción de lo especificado expresamente en este párrafo, no se otorga ninguna otra licencia expresa, implícita o por exclusión. Para obtener información acerca de la disponibilidad de licencias adicionales para practicar las metodologías patentadas, comuníquese con:

Legal Department, Third Wave Technologies, Inc., 502 South Rosa Rd., Madison, WI, 53719, (608) 273-8933.

La prueba de VPH 16/18 Cervista™ utiliza química patentada de Invader® y componentes específicos protegidos por: N.º de patentes de EE.UU. 5,614,402; 5,795,763; 5,846,717; 5,985,557; 5,994,069; 6,001,567; 6,090,543; 6,090,606; 6,348,314, 6,458,535; 6,555,357; 6,562,611; 6,635,463; 6,673,616; 6,759,226; 6,872,816; 6,875,572; 6,913,881; 7,060,436; 7,067,643; 7,087,381; N.º de patentes canadienses. 2,163,015; 2,203,627; N.º de patentes australianas 694,736; 731,062; 737,449; 738,849; 744,369; 779,443; 781,188; N.º de patente japonesa 3,665,648; N.º de patente europea 711,361. Todas las patentes estadounidenses y extranjeras, según corresponda, que se hayan emitido o se emitan, en lo sucesivo, respecto de las solicitudes de dichas patentes, así como todas las solicitudes de patentes y las patentes estadounidenses o extranjeras que se emitan por consiguiente, según corresponda, cuyo objeto, en su totalidad o en parte, tenga derecho al beneficio de las fechas de solicitud de cualquiera de las patentes o solicitudes de patentes antes enumeradas en este prospecto del producto.

GARANTÍA LIMITADA DEL PRODUCTO

Third Wave Technologies, Inc. garantiza que este producto cumplirá las especificaciones establecidas en la hoja de información del producto. Si alguno de los componentes de este producto no cumple estas especificaciones, Third Wave Technologies, Inc. a discreción propia, con responsabilidad única y exclusiva, y como recurso único y exclusivo de los usuarios, reemplazará el producto sin cargo o reembolsará el costo del mismo siempre que se notifique del incumplimiento a Third Wave Technologies, Inc. dentro de los sesenta (60) días de la recepción del producto.

Esta garantía limita la responsabilidad de Third Wave Technologies, Inc. al reemplazo o el reembolso del costo de este producto. THIRD WAVE TECHNOLOGIES, INC. NO PROPORCIONA NINGUNA OTRA GARANTÍA, EXPRESA O IMPLÍCITA, INCLUIDAS, ENTRE OTRAS, LA GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZACIÓN O ADECUACIÓN PARA UN FIN PARTICULAR O NO INCUMPLIMIENTO. Third Wave Technologies, Inc. no tendrá responsabilidad alguna por daños directos, indirectos, consecuentes o incidentales que surjan

del uso, de los resultados del uso o de la incapacidad de uso de este producto y sus componentes Third Wave®, Cleavase® e Invader® son marcas registradas de Third Wave Technologies Inc. Cervista™ e Invader Call Reporter™ son marcas registradas de Third Wave Technologies Inc. Todas las otras marcas comerciales/marcas registradas a las que se hace referencia en este prospecto del producto, son propiedad de sus respectivas compañías.

Algunos componentes del análisis del ácido nucleico, como las composiciones y los métodos específicos de manipulación o visualización de los ácidos nucleicos que se deben analizar, pueden estar cubiertos por una o más patentes de terceros. De forma similar, los ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos específicas pueden estar patentados. La fabricación, el uso o la venta de estos componentes o ácidos nucleicos pueden requerir de una o más licencias. Ninguna parte del contenido de este documento debe considerarse como una autorización o licencia implícita de fabricación, uso o venta de ningún componente o ácido nucleico protegido por dichas patentes.

©2009 Third Wave Technologies, Inc.

P/N 15-3101-2401, Revisión 100